

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ASİT VE TUZA ADAPTE EDİLMİŞ *Escherichia coli* O157:H7 VE *Listeria monocytogenes*'in TÜRK SUCUKLARINDA YAŞAMA DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Fatma YAMAN ÖZTÜRK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ASİT VE TUZA ADAPTE EDİLMİŞ *Escherichia coli* O157:H7 VE *Listeria monocytogenes*'in
TÜRK SUCUKLARINDA YAŞAMA DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma YAMAN ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in asit ve tuz adaptasyonları sağlanarak, asit ve tuza olan dirençleri incelenmiştir. Ayrıca asit ve tuz adaptasyonunun *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in Türk sucuklarında yaşama düzeyleri üzerindeki etkileri de belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside adapte edilmiştir. Aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0 ve 3,5'te, *L. monocytogenes*'in pH 2,5, 3,0 ve 3,5'teki yaşama düzeyleri saptanmıştır. Asit adaptasyonu üzerinde organik (asetik, laktik ve sitrik asit) ve inorganik (HCl) asitlerin etkisi de tespit edilmiştir.

E. coli O157:H7 üzerinde yürütülen adaptasyon denemelerinde, HCl kullanımında pH 5,5'te 3 ve 4 saat, asetik asit kullanımında 3 saat, laktik asit kullanımında ise 3 ve 4 saatlik adaptasyonlar yaşama oranı üzerinde maksimum düzeyde artışa neden olmuştur ($p<0,01$). Sitrik asit kullanımında ise yaşama oranı üzerinde önemli bir artış görülmemiştir. HCl, asetik ve laktik asit adaptasyonu, *L. monocytogenes*'in pH 3,5'te yaşama oranının da artışına neden olmamış, sitrik asit denemelerinde ise, maksimum asit direnci pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 3 saatlik adaptasyonda gerçekleşmiştir ($p<0,01$). *L. monocytogenes*'in pH 2,5'te yaşama oranı üzerinde pH 4,5'te 3 saat, pH 3,0'da yaşama oranı üzerinde ise pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyonlar maksimum düzeyde artışa neden olmuştur ($p<0,01$). Çapraz direnç denemelerinde, asetik asit kullanımında pH 5,5'te 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyonun *E. coli* O157:H7'nin laktik aside olan çapraz direncinde maksimum düzeyde artışa neden olduğu ($p<0,01$), HCl kullanımının ise önemli bir etki oluşturmadığı belirlenmiştir. HCl ve sitrik asit adaptasyonu, *L. monocytogenes*'in laktik aside olan çapraz direncini arttırmamıştır. Tuz adaptasyon denemelerinde, %3,5 NaCl'de 1 saat süreyle tuza adapte edilen kültürler %8 NaCl içeren çözeltilerde 4 °C ve 25 °C'da 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu denemeler sonunda *L. monocytogenes*'in tuza direnç kazanmadığı görülmüş, *E. coli* O157:H7'nin ise 25 °C'da muhafaza edilen kültürde tuz direnci artmış ($p<0,01$), 4 °C'da muhafaza edilen kültürde ise direnç artışı olmamıştır. Asit adaptasyonu, *E. coli* O157:H7'nin Türk sucuğunda yaşama düzeyinde artışa neden olurken ($p<0,01$), *L. monocytogenes*'in yaşama düzeyi üzerinde önemli bir fark oluşturmamıştır. Ayrıca tuz adaptasyonu *E. coli* O157:H7'nin Türk sucuğunda yaşama düzeyini arttırmamıştır.

2010, 132 sayfa

Anahtar Kelimeler: *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, asit adaptasyon, tuz adaptasyon, çapraz direnç, organik asit, inorganik asit, sucuk.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF THE SURVIVAL OF *Escherichia coli* O157:H7 AND *Listeria monocytogenes* ADAPTED TO ACID AND SALT STRESS CONDITIONS IN TURKISH SUCUK

Fatma YAMAN ÖZTÜRK

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

In this research, acid resistance levels of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* have been examined under the conditions of acid and salt adaptations. In addition, the effect of acid and salt adaptations on the survival of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in Turkish sucuk have also been determined. *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were adapted to pH 4.5; 5.0 and 5.5 for the periods of 1, 2, 3 and 4 hours. The survival of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* that were adapted to acid have been ascertained at pH 3.0 and 3.5, and at pH 2.5, 3.0 and 3.5 respectively. The effects of organic acids (acetic, lactic and citric acids) and inorganic acids (HCl) on acid adaptation have also been studied.

At the adaptation tests that were carried out on *E. coli* O157:H7, it has been found that 3 and 4 hours adaptation at pH 5.5 in case of using HCl; 3 hours adaptation in case of using acetic acid, and 3 and 4 hours adaptation in case of using lactic acid have been caused highest survival ($p<0.01$). On the other hand, in case of using citric acid, any notable increase was recorded in survival. It has been found that HCl, acetic acid and lactic acid adaptations at pH 3.5 have resulted in no increase in the survival of *L. monocytogenes*. In case of citric acid experiments, it has been found that maximal acid resistance was realized at the 3 hours adaptation at pH 4.5, 5.0 and 5.5 ($p<0.05$). It has been found that 3 hours adaptation at pH 4.5, and 1, 2, 3, and 4 hours adaptation at pH 5.0 and 5.5 have resulted in maximum increases in the survival of *L. monocytogenes* at pH 2.5 and pH 3.0 respectively ($p<0.01$). At the cross resistance tests, 2, 3, and 4 hours adaptation to acetic acid have been caused maximum level of increases in the cross resistance of *E. coli* O157:H7 to lactic acid ($p<0.05$). But, no significant increase has been observed in case of using HCl. It has been determined that HCl and citric acid adaptation did not increase the cross resistance of *L. monocytogenes* to lactic acid. In the salt adaptation tests, the cultures that were adapted to 3.5% NaCl for the period of 1 hour were left to incubation for 25 days, in 8% NaCl solution, at the temperatures of 4 °C and 25 °C. At the end of these tests, it has been determined that *L. monocytogenes* has not gained any resistance to salt, and salt resistance of *E. coli* O157:H7 in the culture, which was kept at 25 °C ($p<0.05$), increased while the resistance in the culture, which was kept at 4 °C did not increase. While acid adaptation enhanced the survival of *E. coli* O157:H7 in Turkish sucuk ($p<0.01$), not significant difference occur at the survival of *L. monocytogenes*. In addition, salt adaptation did not enhanced the survival of *E. coli* O157:H7 in Turkish sucuk.

2010, 132 pages

Keywords: *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, acid adaptation, salt adaptation, cross resistance, organic acids, inorganic acids, Turkish sucuk.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a, çalışmam süresince beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyesi Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a ve Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e, istatistik analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Muhip ÖZKAN ve Araş. Gör. Rabia ALBAYRAK'a, sucuk yapımında yardım eden tekniker Ali Nacak'a ve laborant Mustafa GAYRETLİ'ye, bakteri temininde yardımcı olan Prof. Dr. Aydın Öztan'a, Pınar Et A.Ş'ye ve Kalite Sistem Laboratuvar çalışanlarına, tüm eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen ailem ve eşim Engin ÖZTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fatma YAMAN ÖZTÜRK

Ankara, Mart 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Bakterilerin Asidik Ortamlarda Canlı Kalmalarına Olanak Sağlayan Sistemler.....	4
2.1.1 Sitoplazma pH'sının düzenlenmesi.....	4
2.1.2 Asit tolerans yanıtı (ATY).....	6
2.1.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7'nin asit tolerans yanıtı	11
2.1.2.2 <i>L. monocytogenes</i> 'in asit tolerans yanıtı.....	15
2.1.3 Adaptasyonda etkili olan faktörler	18
2.1.4 Çapraz direnç.....	24
2.1.5 Aside tolerans kazanmanın patojenitedeki rolü.....	30
2.1.6 Aside tolerans kazanmanın gıda endüstrisindeki önemi.....	34
2.1.7 Tuza tolerans kazanma.....	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1 Materyal	46
3.1.1 Bakteri kültürleri.....	46
3.1.2 Sucuk üretiminde kullanılan hammadde ve starter kültür.....	46
3.2 Yöntem.....	46
3.2.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması.....	46
3.2.2 Bakterilerin gelişme eğrisinin oluşturularak durma fazının saptanması.....	47
3.2.3 Bakterilere aside tolerans kazandırma	47
3.2.4 Aside tolerans kazandırılan kültürlerin aside dirençlerinin belirlenmesi.....	48

3.2.5 Bakterilerin laktik aside olan çapraz dirençlerinin belirlenmesi.....	48
3.2.6 Bakterilerin tuza tolerans kazandırılması ve tuz dirençlerinin belirlenmesi.....	49
3.2.7 Sucuk üretimi	50
3.2.8 Sucuklarda mikrobiyolojik analizler	50
3.2.9 Sucuklarda kimyasal analizler	51
3.2.9.1 pH değerinin belirlenmesi.....	51
3.2.9.2 Nem miktarının belirlenmesi.....	51
3.2.10 İstatistik analiz.....	52
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	53
4.1. <i>L. monocytogenes</i> ve <i>E. coli</i> O157:H7'nin Gelişme Eğrisi	53
4.2 <i>L. monocytogenes</i> 'in HCl ile Aside Toleranslı Hale getirilmesi.....	54
4.3 <i>L. monocytogenes</i> 'in Organik Asitler ile Aside Tolerans Kazandırılması.	67
4.4 <i>L. monocytogenes</i> 'in Laktik Aside Karşı Çapraz Direncinin Belirlenmesi.....	78
4.5 <i>E. coli</i> O157:H7'nin HCl ile Aside Tolerans Kazandırılması.....	81
4.6 <i>E. coli</i> O157:H7'nin Organik Asitler ile Aside Tolerans Kazandırılması.	90
4.7 <i>E. coli</i> O157:H7'nin Laktik Aside Karşı Çapraz Direncinin Belirlenmesi.....	94
4.8 <i>L. monocytogenes</i> ve <i>E. coli</i> O157:H7'nin Tuz Toleransının Belirlenmesi.	97
4.9 Aside Adapte Edilmiş <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> 'in Türk Sucuğunda Yaşama Düzeylerinin Belirlenmesi	101
4.9.1 Olgunlaştırma ve depolama süresince <i>E. coli</i> O157:H7'nin canlı kalma oranındaki değişim.....	101
4.9.2 Olgunlaştırma ve depolama süresince <i>L. monocytogenes</i> 'in canlı kalma oranındaki değişim.....	105
4.9.3 Olgunlaştırma ve depolama süresince LAB ve <i>Staphylococcus</i> sayısı ile pH değerindeki değişim.....	109
4.9.4 Olgunlaştırma ve depolama süresince ölçülen nem düzeyindeki değişim.....	111
4.10 Tuza Adapte Edilmiş <i>E. coli</i> O157:H7'nin Türk Sucuğunda Yaşama Düzeyinin belirlenmesi.....	112

5. SONUÇ.....	116
KAYNAKLAR.....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	132

SİMGELER DİZİNİ

ATY	Asit Tolerans Yanıtı
ATK ⁺	Aside tolerans kazandırılmış
ATK ⁻	Aside tolerans kazandırılmamış
BPA	Baird Parker Agar
Kob	Koloni oluşturan birim
KÜEN	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kültür Koleksiyonu
MRD	Maximum Recovery Diluent
MRSA	De Man Rogosa Sharp Agar
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ATY'nin iki aşamalı çalışma sisteminin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.2 Asit tolerans yanıtı.....	11
Şekil 2.3 Stres yanıtında rol oynayan sistemler	17
Şekil 4.1 <i>L. monocytogenes</i> 'in gelişme eğrisi.....	53
Şekil 4.2 <i>E. coli</i> O157:H7'nin gelişme eğrisi.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bakterilere Aside Tolerans Kazandırma ve Aside Dirençlerinin Belirlenmesi.....	49
Çizelge 4.1 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	55
Çizelge 4.2 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	56
Çizelge 4.3 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 2,5'teki kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	57
Çizelge 4.4 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	59
Çizelge 4.5 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	60
Çizelge 4.6 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	61
Çizelge 4.7 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	62
Çizelge 4.8 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	63
Çizelge 4.9 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	64
Çizelge 4.10 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmalar.....	65

Çizelge 4.11 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	65
Çizelge 4.12 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	66
Çizelge 4.13 pH 4,5'te asetik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	68
Çizelge 4.14 pH 5,0'da asetik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	69
Çizelge 4.15 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	70
Çizelge 4.16 pH 4,5'te laktik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	70
Çizelge 4.17 pH 5,0'da laktik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	71
Çizelge 4.18 pH 5,5'te laktik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	72
Çizelge 4.19 pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	75
Çizelge 4.20 pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	75
Çizelge 4.21 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	76
Çizelge 4.22 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	77

Çizelge 4.23 pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	78
Çizelge 4.24 pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	79
Çizelge 4.25 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	80
Çizelge 4.26 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>L. monocytogenes</i> 'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	80
Çizelge 4.27 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	82
Çizelge 4.28 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. Coli</i> O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	82
Çizelge 4.29 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	84
Çizelge 4.30 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmalar.....	86
Çizelge 4.31 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	87
Çizelge 4.32 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	88
Çizelge 4.33 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	89
Çizelge 4.34 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	90

Çizelge 4.35 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart	91
Çizelge 4.36 pH 5,5'te laktik aside tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	92
Çizelge 4.37 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	93
Çizelge 4.38 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin laktik aside karşı çapraz direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	95
Çizelge 4.39 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan <i>E. coli</i> O157:H7'nin laktik aside karşı çapraz direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	96
Çizelge 4.40 Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan <i>L. monocytogenes</i> 'in %8 NaCl'deki direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart sapmaları.....	97
Çizelge 4.41 Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan <i>E. coli</i> O157:H7'nin %8 NaCl'deki direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL) ve standart	99
Çizelge 4.42 Olgunlaştırma (Fermentasyon + Kurutma) ve depolama döneminde <i>E. coli</i> O157:H7 sayısı, LAB sayısı, <i>Staphylococcus</i> sayısı, pH ve % nem miktarı.....	102
Çizelge 4.43 Olgunlaştırma (Fermentasyon + Kurutma) ve depolama döneminde <i>L. monocytogenes</i> sayısı, LAB sayısı, <i>Staphylococcus</i> sayısı, pH ve % nem miktarı.....	106
Çizelge 4.44 Olgunlaştırma (Fermentasyon + Kurutma) ve depolama döneminde <i>E. coli</i> O157:H7 sayısı, <i>Lactobacillus</i> sayısı, <i>Staphylococcus</i> sayısı, pH ve % nem miktarı.....	114

1. GİRİŞ

Gıda patojenlerinin kontrol altına alınabilmesi için, gıdaların işlenmesi ve muhafazası sırasında yüksek sıcaklık uygulaması, soğukta muhafaza, tuz ve asit uygulaması gibi çeşitli stres ajanları kullanılmaktadır. Geleneksel olarak bu yöntemlerin güvenli olduğu düşünülmese de, son yıllarda yapılan araştırmalarda patojen mikroorganizmaların çeşitli stres koşullarına adapte olarak direnç kazandığı gösterilmiştir (Gutierrez vd. 1995, Russell vd. 1995, Gahan vd. 1996, Lou ve Yousef 1997, Dikici 2009).

Taze et yüzeyindeki mikroorganizmaların organik asitlerle yıkanması ve fermantasyon gibi birçok gıda üretim teknolojisinde düşük pH uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Asit uygulamalarının sürekli kullanımı ile patojenlerin asit adaptasyon yetenekleri artmakta ve aside daha dirençli hale gelmektedir. Gıdaların hazırlanması sırasında kullanılan organik asitler mikroorganizmaların hücre içi pH'sını, hidrojen iyonlarının hücre sitoplazmasına akışıyla azalmaya zorlar, böylece metabolizmayla ilgili çeşitli fonksiyonlar durur ve mikrobiyel gelişim kontrol altına alınmış olur (Hill vd. 1995, Koutsoumanis ve Sofos 2004).

Araştırmaların çoğu, gıda kaynaklı hemorajik kolit vakalarında anahtar rol oynayan *Escherichia coli* O157:H7'nin aside dirençli olduğunu ve bu toleransın midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesini sağladığını göstermiştir. Bu bakterinin aside direnci, insanlarda enfeksiyon dozunun çok düşük olmasını etkileyen bir faktör olarak kabul edilmektedir. Mayonez, fermente etler, cottage peyniri gibi asitli gıdalarda diğer patojenler inhibe olurken, bu asit ortamın *E. coli* O157:H7'nin rahatlıkla gelişebilmesi için bir avantaj olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği ile elma suyu ve geleneksel olarak güvenli kabul edilen fermente et ürünlerinde canlılığını koruyabilmektedir. pH'sı 3,6-4,0 olan elma şarabında 8 °C'da 31 gün canlı kalabilen *E. coli* O157:H7'nin, % 40'dan fazla mayonez içeren ve pH'sı 5,40-6,07 olan et salatasında canlılığını uzun süre koruyabildiği tespit edilmiştir. pH 4,2'de bir kaç hafta canlı kalabildiği, hatta et salatasının karakteristik pH'sında gelişebildiği ve inhibitör etkinin asetik > laktik > sitrik asit şeklinde olduğu belirlenmiştir. Elma şarabı ve portakal suyu gibi asidik gıdalardan kaynaklanan enfeksiyonların artması asidik

gıdaların güvenliği hakkındaki soruların artmasına neden olmuştur (Roering vd. 1999, Halkman vd. 2001, Schurman 2001, Bjornsdottir vd. 2006).

Listeria monocytogenes, epidemik ve sporadik gıda kaynaklı hastalıkların nedeni olarak kabul edilen bir patojendir. Gastroenteritis, sepsis, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, düşük ve ölü doğum gibi ciddi vakalara neden olmaktadır. Bu patojen, geniş bir sıcaklık aralığında (-1 ve 45 °C), düşük pH ve yüksek tuzlulukta (%10 NaCl) gelişme yeteneğine sahiptir (Viallette vd. 1998, Doğan 2000, Dykes ve Moorhead 2000, Tunali 2000, Ribeiro vd. 2006, Severino vd. 2007).

L. monocytogenes 4 °C'da depolanan portakal suyunda (pH 3,6) 4 gün, fermente ette (pH'sı 4,3-4,5 ve su aktivitesi 0,79-0,86) 84 gün boyunca canlılığını sürdürmüştür (Kara vd. 1999, Shabala vd. 2008).

L. monocytogenes'in canlı kalma oranı üzerinde gıdaların işlenmesi ve korunması sırasında uygulanan yöntemlerin etkili olduğu bilinmektedir. Buna rağmen, bu patojenin stres koşullarına adaptasyon yeteneğinin de, gıda üretimi ile ilgili olduğu saptanmıştır (Norrung vd. 1999, Bolton ve Frank 1999, Gandhi ve Chikindas 2007, Sergelidis ve Abraham 2009).

Asidik gıdalardaki düşük pH, mikrobiyel stabilite ve güvenlik açısından önemli bir rol oynamaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in asit tolerans mekanizması sayesinde, düşük pH'lı gıdalarda canlı kalma oranının arttığını göstermiştir (Leyer vd. 1995, Gahan vd. 1996).

Asit tolerans yanıtı (ATY), temelde bazı patojen bakterilerin belirli bir süre orta derecede asitli (pH 5,0-6,0) ortamlara maruz kalması sonucu spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlara direnç kazanması ile oluşur (Foster ve Hall 1990, Foster 1991, Leyer vd. 1995, O'driscoll vd. 1996, Riesenberk vd. 1996). Asit tolerans kazanmış patojenlerin fermente et ve süt ürünleri gibi asidik gıdalarda uzun süre canlı kalabildiği birçok araştırmacı tarafından

tespit edilmiştir (Lindqvist ve Lindblad 2009, Leyer vd. 1995, Riordan vd. 2000, Gahan vd. 1996). Aside tolerans kazanmış patojen bakteriler, hem gıda sanayisi hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bu araştırmada, gıda zehirlenmelerine neden olabilen *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in asit ve tuz adapte hücrelerinin elde edilerek, bu hücrelerin kuvvetli asit ve yüksek tuz konsantrasyonuna olan toleranslarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca asit ve tuza karşı en yüksek düzeyde tolerans kazanan kültürün Türk sucuğunda kullanımı sonucu, bu ortama adaptasyon ve canlı kalma düzeyi de tespit edilmiştir.

Araştırmanın ilk aşamasında, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* farklı organik ve inorganik asitler kullanılarak farklı pH'lara ayarlanan Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde aside adaptasyon amacıyla 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle tutulmuştur. Bu işlemin sonunda aside adapte edilen ve edilmeyen kültürlerin pH 2,5; 3,0 ve 3,5'te yaşama düzeyleri belirlenmiştir. Tuz adaptasyonunda, %3,5 NaCl içeren TSB besiyerinde 1 saat süreyle tuza adapte edilen kültürler, %8 NaCl içeren ortamda 4 °C ve 25 °C'da inkübe edilerek tuza olan toleransları saptanmıştır. Araştırmanın ikinci aşamasında, asit ve tuza en yüksek düzeyde direnç kazanan kültürler Türk sucuklarına ilave edilerek, bu ortama adaptasyon ve canlı kalma düzeyleri tespit edilmiştir. Bu asit ve tuza dirençli patojenlerin yaratabileceği sağlık riskleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bakterilerin Asidik Ortamlarda Canlı Kalmalarına Olanak Sağlayan Sistemler

2.1.1 Sitoplazma pH'sının düzenlenmesi

Bakteriler, bulundukları ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikleri algılayarak belirli bir süre içinde uyum sağlama yeteneğine sahiptir. Buna pH homeostasis mekanizma adı verilir. Bu mekanizma, dış ortam pH'sında meydana gelen değişikliklere karşı, sitoplazma pH'sının nötr değerlere yakın kalmasını sağlar. *E. coli*'de, ortam pH'sı 4,5-7,9 aralığında iken, pH'da meydana gelen 1 birimlik değişimin, sitoplazma pH'sında 0,1 birimden daha az değişikliğe neden olduğu bildirilmektedir (Hill vd. 1995, Tosun 2003).

Hücre zarının, proton ve diğer iyonları geçirgenlik özelliğinin düşük olması, sitoplazma pH'sında büyük değişimlerin olmasını önler. Ortamda bulunan protonlar, hücre zarından kolayca geçip sitoplazma pH'sını düşüremez. Hücre zarının bu geçirgenlik özelliği, disosiyasyon olmayan zayıf asitlerle muamele sonucunda bertaraf edilebilir. Sitoplazma pH'sının önemli ölçüde değişimini engelleyen, ikinci faktör, hücrenin yüksek tamponlanma kapasitesidir. Bu olay, sitoplazmanın protein içeriği ile sitoplazmik glutamat ve poliamin birikiminin bir sonucudur (Hill vd. 1995).

Bakteri sitoplazması, dış ortama göre daha baziktir. Bakteri, gelişmek ve yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmek için sitoplazma pH'sını kontrol etmek zorundadır. Sitoplazmanın tampon kapasitesi, düşük proton geçirgenliği ve sitoplazmadan proton kaçışını içeren pH homeostasis sistemi bakterileri korumaktadır. Ancak pH homeostasisini oluşturan bütün bu sistemler bakteriyi etkili bir şekilde asitten koruyamaz. Özellikle zayıf asitler, bakteri hücre zarından kolaylıkla geçerek sitoplazmada çözünmekte ve sitoplazma pH'sını düşürmektedir. Zayıf asitlerin etkisi, pH düştükçe daha çok artmaktadır. Bu durumda bakteri, üremeden ziyade hayatta kalmaya çalışır. Ancak dış ortamın pH'sı 4,6'nın altına düştüğünde mevcut pH

homeostasis sistemi bakterinin asitten korunması için yetersiz kalır ve bakteri hızla ölmeye başlar (Çakmakçı ve Karahan 1995, Hill vd. 1995, Benjamin ve Datta 1995).

pH homeostasis sistem dış ortam pH'sındaki değişimlere karşı sitoplazmadaki pH'nın nispeten sabit kalmasını sağlayarak hücreleri aside karşı dirençli hale getirir. Bununla beraber, *Salmonella* Typhimurium ve *E. coli*'de hücreleri asit stresten koruyan genetik yanıt keşfedilmiştir. pH 5,5-6,0'da tetiklenen bu yanıt adaptif olmayan pH homeostasis sistemin başaramadığı durumlarda pH 3,0-4,0 gibi kuvvetli asitten hücreleri korumaktadır (Foster ve Hall 1991, Hill vd. 1995, Tunail 2009).

Asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7 hücrelerinin proton geçirgenliği önemli düzeyde azalmaktadır (Sainz vd. 2005).

Düşük pH stresine karşı hücrelerin nasıl korunduğunu belirlemek amacıyla iki aşamalı bir model çalışılmıştır. Ön asit şoku olarak ifade edilen ilk aşamada (pH 5,8) pH bağımlı homeostasis sistem indüklenir. Bakteri, pH'sı 4,0'dan düşük bir ortama maruz bırakıldığında, aside tolerans kazanan kültürün sitoplazma pH'sı aside tolerans kazanmamış kültüre göre daha yüksektir. Aside tolerans kazanmamış kültür, ortam pH'sı 4,0'ın altına düştüğünde sitoplazma pH'sını kontrol edemezken, aside tolerans kazanmış kültür aynı koşullarda sitoplazma pH'sını 5,0'ın üzerinde tutabilmekte ve proteinlerin asit denatürasyonunu en az düzeye indirmektedir (Foster ve Hall 1991).

Dış ortamın pH değerleri 7,5 ile 4,0 arasında iken hücre pH'sı değişmemektedir. Fakat ortam pH'sı 3,3 olduğunda sitoplazma pH'sı aside tolerans kazanmış ve kazanmamış hücreler arasında farklılık gösterir. Aside tolerans kazanmamış hücrelerin sitoplazma pH'sı tolerans kazanan hücrelere kıyasla 0,5-0,9 birim daha düşüktür. Bu veriler, asit adaptasyonu ile sitoplazma pH'sının daha iyi korunduğu hipotezini desteklemekte olup, bu koruyuculuğun asit tolerans yanıtı (ATY) bağımlı pH homeostasis sistem tarafından sağlandığı belirlenmiştir (Foster ve Hall 1991).

Browne ve Dowds (2002) tarafından yürütülen çalışmada, aside adapte edilen ve edilmeyen *Bacillus cereus*'un pH'sı 4,6 olan ortamda hücre içi pH değerleri araştırılmış ve aside adapte edilen hücrelerin sitoplazma pH'sının daha iyi korunduğu ve ayrıca kullanılan asit çeşidine bağlı olarak hücre içi pH değerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin, daha düşük pKa (2,98) değerine sahip salisilik asitte sitoplazma pH'sı, daha yüksek pKa (4,19) değerine sahip benzoik aside kıyasla daha iyi korunmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bazı patojen bakterilerin asidik ortamlarda canlı kalmalarına olanak sağlayan pH homeostasis sisteminden farklı olarak protein sentezini gerektiren indüklenabilir asit direnç sistemleri geliştirdikleri ortaya konulmuştur. Bakterinin aside tolerans kazanmasını sağlayan bu sistemler belirli koşullar altında indüklenmekte ve belirli genler tarafından kontrol edilmektedir (Tosun 2003).

2.1.2 Asit tolerans yanıtı (ATY)

Gıda patojenleri, gıdaların hazırlanması ve işlenmesi sırasında farklı stres koşullarına maruz kalmaktadır. Mikroorganizmaların gelişimi ve yaşaması üzerine stres koşullarının zararlı etkileri tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların stres yanıt sistemi farklı stresler tarafından aktive olarak birçok strese karşı koruma sağlar. Gıda üretimi sırasında mikrobiyel popülasyonun kontrol edilmesi amacıyla yaygın olarak pH, NaCl ve sıcaklık uygulaması yapılmaktadır (Lou ve Yousef 1997).

Stres yanıtı, mikroorganizmaların bulundukları ortamda meydana gelen değişimlere karşı direnç sağlar. Mikroorganizmalar strese maruz kaldıklarında çeşitli şekillerde yanıt oluşturur (Campbell vd. 2004).

Hücreleri koruyan, yıkımını önleyen ya da stres ajanlarını elimine eden proteinlerin üretimi, stres faktörlerine karşı tolerans ya da direnç artışının sağlanması, spor gibi dormant durumdaki hücre formasyonlarının oluşması, konak organizmanın savunmasından kaçma ya da adaptif mutasyonlar gerçekleşerek mikroorganizmalar

strese maruz kaldığında adaptif ya da koruyucu yanıt oluşmaktadır. Bu yanıt mikroorganizmaların aynı ya da farklı tipte streslere karşı tolerans yanıtını arttırmaktadır. Bu olay, adaptif yanıt ya da tolerans olarak tanımlanmaktadır (Azizoğlu 2005).

Asit toleransı sırasında bakterilerde meydana gelen değişimler üç temel sınıfta incelenmiştir. Bunlar; hücre zarı kompozisyonunda meydana gelen değişimler, sitoplazma pH'sının korunması için meydana gelen enzimatik ve fizyolojik değişimler ile asidik pH tarafından temel hücresel komponentlerin yıkımının önlenmesi ya da tamirinin gerçekleştirilmesi şeklinde sıralanmıştır. Sitoplazmanın tampon kapasitesi, düşük proton geçirgenliği ve hücre zarında meydana gelen proton pompasının, asit direnç mekanizmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Foster ve Hall 1991, Leyer vd. 1995, Gahan vd. 1996, Choi vd. 2000).

Listeria monocytogenes, *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* gibi gıda kaynaklı patojenlerde asit tolerans yanıtı tespit edilmiştir. Çalışmaların çoğunda adaptif asit toleransına bağlı olarak meydana gelen moleküler ve fizyolojik değişimler incelenmiştir. Adaptif asit toleransı, organizmanın türüne, gelişme fazına, gelişme ortamına, asit çeşidine (organik/ inorganik) ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak gerçekleşen ve farklı sistemlerden oluşan kompleks biyolojik bir mekanizma olarak ifade edilmektedir. Bu mekanizmada, hücre zarının yağ asidi içeriğinde değişimler ve protein sentezinde değişiklikler meydana gelerek, hücreler asidin öldürücü etkilerinden korunmuş olmaktadır (Koutsoumanis ve Sofos 2004).

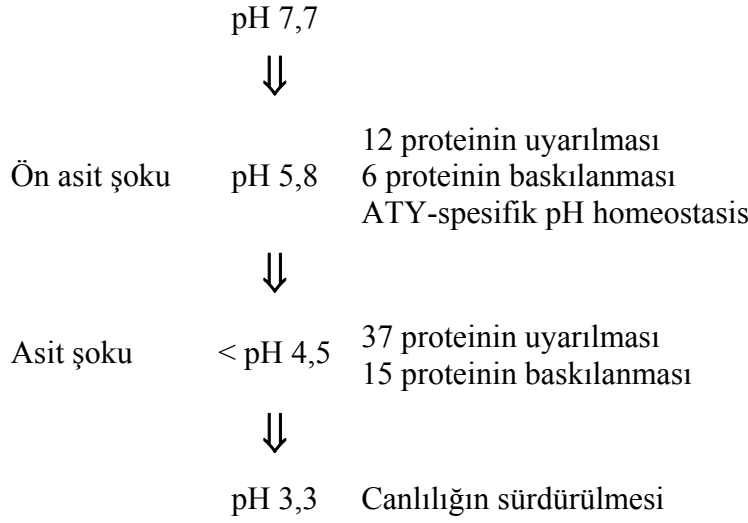
Son yıllarda *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, bu bakterilerde asidik ortamlara uyum sağlamalarına yarayan mekanizmaların olduğunu ortaya koymuştur. Bu patojen bakteriler orta derecede asitli ortamlara belirli bir süre maruz kalırsa spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamda canlılıklarını sürdürebilmektedir. Yüksek asitliğe karşı kazanılan bu direnç ATY olarak ifade edilmektedir (Foster ve Hall 1990, Foster 1991, Leyer vd. 1995, O'driscoll vd. 1996, Riesenber vd. 1996).

ATY, ilk defa *S. Typhimurium*'da keşfedilmiş bir sistemdir. Bu sistem, bakterinin hafif asidik bir ortama kısa bir süre maruz kalması durumunda indüklenir ve bakterinin ölümcül pH değerlerinde yaşamını sürdürmesine olanak sağlar (Foster ve Hall 1990).

S. Typhimurium, pH'sı 5,0 olan besiyerinde gelişebilmekte, pH 4,0'ın altında ise hızla ölmektedir. Ortam pH'sı 4,0'ın altına indiğinde pH homeostasis sistemi etkili olamamaktadır. *S. Typhimurium*'un 5,0 ile 9,0 arasındaki pH değerlerinde gelişme özelliğine sahip olduğu, fakat son yıllarda yapılan araştırmalarda bakterinin asidik mide ve makrofaj fagolizozomları gibi düşük pH'lı ortamlarda da gelişebildiği gösterilmiştir. Bu patojeni pH 4,0'ın altındaki asit koşulların öldürücü etkilerinden koruyan mekanizmanın asit tolerans yanıtı olduğu belirlenmiştir (Foster 1991, Tamplin 2005).

ATY yanıtında, iki farklı pH bağımlı asit tolerans sistemi keşfedilmiştir. Bunlardan biri logaritmik faz ATY'si, diğeri durma fazı ATY'sidir. Diğeri bir sistem ise gelişimin durma fazında görülen pH bağımsız sistem olup, *rpoS* genini içermektedir (Arnold ve Kaspar 1995, Berry vd. 2004).

Logaritmik faz ATY'si, iki aşamadan oluşan bir sistemdir. Ön asit şoku olarak ifade edilen birinci aşamada, bakteri belirli bir süre pH 5,0-6,0 dolaylarında bir ortama maruz kalmakta ve asit şok proteinleri (ASP) denilen özel proteinler sentezlenmektedir. Bu aşamada 18 polipeptit sentezi gerçekleştiği bildirilmektedir. Bunlardan 12'si uyarılmakta, 6'sı ise adaptasyon sırasında baskılanmaktadır. Bu sistem hücrede demir emilişinden sorumlu olan *fur* geni tarafından kontrol edilmektedir. Asit şoku olarak ifade edilen ikinci aşamada; bakterinin bulunduğu ortam pH'sı 4,5'ten küçüktür. Bu aşamada en az 52 protein sentezlenmektedir. Bu iki aşamadan sonra bakteride ATY uyarılmış olur ve bakteri türden türe değişmekle birlikte pH 3,0-4,0 değerlerinde uzun süre canlı kalabilir (Şekil 2.1). ASP'lerin, düşük pH'nın öldürücü etkisinden hücreyi nasıl koruduğu tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.1 ATY'nin iki aşamalı çalışma sisteminin şematik gösterimi (Foster 1991)

Ancak bu proteinlerin pH 5,5'in altında hücre içi proteinlerinin denatürasyonunu önlediği düşünülmektedir. pH 5,0-5,5 değerleri arasında hücre çoğalamamakta ve bu pH değerlerinin altında ölüm hız kazanmaktadır. Bu aşamada ASP'lerin bakterinin sitoplazma pH'sını düzenlediği veya hücre içi organellerini asidin zararlı etkisinden koruduğu düşünülmektedir (Foster 1991). Asit şoku sırasında *DnaK* ve *GroE* proteinleri gibi çaporonin sınıfı proteinler sentezlenmektedir. Bunlar, sıcaklık ve asit ile denatüre olan proteinleri doğal formunda tutabilmektedir (Bang vd. 2000, Foster 1991). Durma fazı ATY'si, logaritmik faz ASP'lerinden farklı olarak sentezlenen 15 proteinin senteziyle karakterizedir. Bu proteinler, logaritmik faz ASP'lerinden farklı olarak geçici olarak sentezlenmekte ve pH 4,3'e birkaç saat dayanabilmektedir (Lee vd. 1994, Riesenbergr vd.1996).

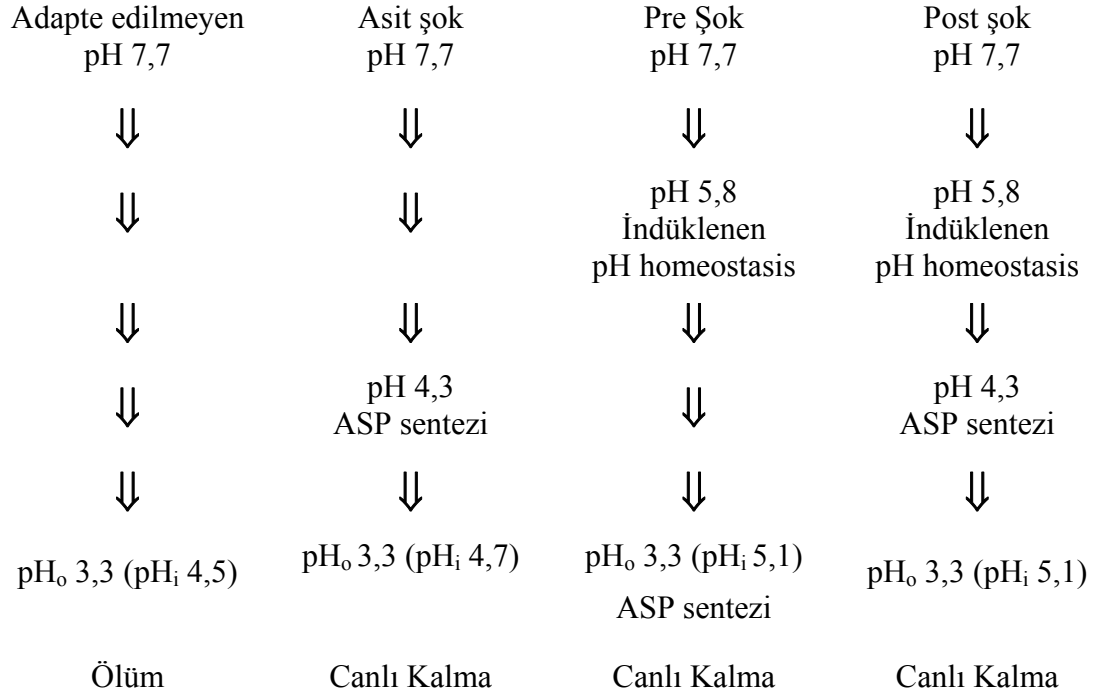
Foster (1993), farklı uygulamaların ATY indüksiyonu ve bakterilerin canlı kalması üzerindeki etkilerini araştırmıştır. *S. Typhimurium*'da, ATY yanıtının pH 5,8'de indüklenen ön asit şok aşaması ve pH 4,5'te indüklenen "asit şok sonrası" aşaması olmak üzere iki aşamadan oluştuğu bilinmektedir. Ön asit şok aşamasında, hücre içi pH'sının korunmasını sağlayan ATY-spesifik pH homeostasis sistem indüklenmekte, asit şok sonrası aşamasında ise makromoleküllerin asit yıkımının önlenmesi ve tamirinde önemli role sahip ASP'lerin sentezi gerçekleşmektedir. Düşük pH'lara karşı maksimum koruma için iki aşama gerekli olup, asit şoku (pH 4,3) kısa sürede (15

dakika) tek başına pH 3,3'ü tolere edebilmekte iken, asit şoku 30 dakikadan daha uzun süre uygulandığında bu koruyucu etki oluşmamaktadır. Sonuç olarak ASP'ler pH 4,3'te geçici olarak sentezlenmekte ve daha sonra yok olmakta ve hücreler düşük pH stresine karşı savunmasız hale gelmektedir (Şekil 2.2) (Foster 1993).

Asit stres yanıtı, pH homeostasis sistem tarafından sağlanmaktadır. Bu sistem daha yüksek düzeydeki sitoplazma pH'sını (pH_i), düşük ortam pH'sına (pH_o) karşı korur. Ortam pH_o 'sının 5,8 ve sitoplazma pH_i 'sının 4,0 olduğu durumda *S. Typhimurium* hücrelerinin yaşama oranı % 100'dür. pH 5,8'e adapte edilen logaritmik faz hücrelerinin pH 3,3'te gerçekleşen asit şokunda yaşama oranı, adapte edilmeyen hücelere kıyasla daha yüksektir. Hücrelerin pH 3,3'te yaşayabilmeleri için asit şok proteinlerinin sentezi gereklidir. Asit şok proteinlerinin çoğu pH 5,8'de sentezlenmemektedir (Foster 1993).

Foster ve Hall (1990), durma fazı ve logaritmik faz *Salmonella* hücrelerinin asit tolerans yanıtını tespit etmek amacıyla, bu hücreleri 30-60 dakika süreyle ılımlı (pH 5,8) ve orta (pH 4,5) düzeyde asit koşullara maruz bırakmış ve bu süre sonunda hücreleri pH 3,0'a aktarmıştır. Araştırma sonunda *Salmonella*'nın durma fazı hücrelerinin logaritmik faz hücrelerinden daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Durma fazı ve logaritmik faz hücrelerinin asit adaptasyonu sırasında protein sentezi gerçekleşmektedir. Lee vd. (1994) tarafından *S. Typhimurium* üzerinde yapılan çalışmada, bu bakterinin durma fazı hücrelerinin pH 3,0'a olan toleransının, logaritmik faz hücrelerinden 1.000 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Salmonella'da *OmpR*, σ^S , *fur* ve *Ada*, *L. monocytogenes*'te σ^B , *Bacillus subtilis*'te σ^H asit şok proteinleri olarak tanımlanan regülatör proteinlerdir. *S. Typhimurium*'da asit stres yanıtının, *rpoS* geni tarafından kodlanan alternatif sigma faktör (σ^S) tarafından regüle edildiği belirlenmiştir (Rees vd. 1995, Gahan ve Hill 1999, Berry ve Cutter 2000, Yuk ve Schneider 2006).



Şekil 2.2 Asit Tolerans Yanıtı (Foster 1993)

Fizyolojik çalışmalar sonucunda, düşük pH stresine karşı korumada ATPaz enziminin de önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Foster ve Hall 1991, Hill vd. 2002). pH 7,0'da geliştirilen *S. Typhimurium* DT104 suşunun ATPaz düzeyinin pH 5,0 ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu saptanmıştır (Berk vd. 2005).

2.1.2.1 *E. coli* O157:H7'nin asit tolerans yanıtı

E. coli O157:H7 soğukta depolanan, düşük su aktivitesine sahip ürünlerde ve asidik gıdalarda canlılığını uzun süre muhafaza eder. Bu ortamlarda karşılaştığı olumsuz çevre koşullarına adapte olarak direnç kazanabilir. Yapılan çalışmalar *E. coli* O157:H7'nin, pH 4,5-5,5 değerlerinde bir ortama maruz kalması durumunda aside adapte olarak direnç kazandığını göstermektedir. ATY, *E. coli* O157:H7'nin hem asidik gıdalarda hem de fermente gıdalarda aside direnç kazanarak canlılığını sürdürmesini sağlar. Ayrıca ATY, *E. coli* O157:H7'nin enfeksiyon dozunun çok düşük olmasından sorumlu olan bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Tosun ve Gönül 2003).

Bir hipoteze göre sığırların sindirim sistemi, bahsedilen bu aside tolerans kazanma mekanizmalarından bir veya daha fazlasının indüklenmesine olanak sağlamaktadır. Kontamine olmuş gıdanın yenmesiyle, daha önceden aside adapte olan bakteri, konakçının midesinden geçerek bağırsaklarda kolonize olmakta ve enfeksiyon oluşturmaktadır. Aside direnç sistemleri soğukta depolama boyunca da etkinliğini devam ettirmektedir. *E. coli* O157:H7, et ürünlerine veya diğer gıdalara bulaştığında, gıda uygun koşullarda depolandığı takdirde aside direnç özelliğini korumaktadır (Lin vd. 1996).

Cutter ve Siragusa (1994), organik asitlerle yıkama işlemi ile sığır karkaslarına bulaşan *E. coli* O157:H7'nin tamamen yok edilemeyeceğini belirlemişlerdir. Bakterinin aside tolerans kazanması durumunda, mayonez, ketçap ve meyve suları gibi bazı asidik gıdalarda yaşama oranı artmaktadır (Weagant vd. 1994, Tsai ve Ingham 1997).

Enterobacteriaceae familyasındaki bakterilerde asit direnci, farklı ortamlardaki aminoasit varlığında gerçekleşmektedir. *E. coli* O157:H7'nin durma fazı hücreleri üzerinde yürütülen çalışmalarda, glukoz bağımlı AR1, glutamat bağımlı AR2, arjinin bağımlı AR3, lisin bağımlı AR4 sistemleri tespit edilmiştir (Adhikari 2005, Bhagwat vd. 2006, Kieboom ve Abee 2006).

E. coli O157:H7'de tespit edilen asit direnç sistemleri; asitle indüklenen arjinin dekarboksilaz, asitle indüklenen glutamat dekarboksilaz ve asitle indüklenen oksidatif sistemdir. İlk iki sistemin çalışması için ortamda arjinin veya glutamatın bulunması gereklidir. Bazı koşullarda her iki sistem de aynı anda aktif olabilir. Üçüncü sistem durma fazı döneminde aktiftir ve karbohidrata gerek duymadan çalışabilir. Bu sistemler bir yandan bakterinin asidik gıdalarda yaşamını sürdürmesine olanak tanırken, diğer taraftan sindirim sisteminde karşılaştığı asidik ortama direnç göstererek hastalık oluşturma şansını artırır. Bu sistemler *E. coli* O157:H7'de doğal olarak bulunur ve nötral pH'larda bulunan bakterinin pH 3,0 veya daha altındaki bir ortama maruz kalması durumunda indüklenir. Bu sırada asit şok proteinleri sentezlenmez (Tosun ve Gönül 2005).

E. coli O157:H7'de ilk olarak tespit edilen direnç sistemi olan AR1, pH 5,5'te glukoz içermeyen kompleks ortamlarda, durma fazındaki hücrelerde görülür. Bu hücreler pH 2,5'e sahip ortamlarda birkaç saat canlı kalabilmektedir. AR1, alternatif sigma faktör *rpoS* tarafından regüle edilmektedir. Glukoz kullanımı ile AR1'in baskılanmasıyla aminoasit bağımlı AR sistemlerinin varlığı keşfedilmiştir. Bu sistemlerden AR2, pH 5,5'e sahip glukoz içeren kompleks ortamlarda durma fazındaki hücrelerde oluşur ve bu hücreler pH 2,0-2,5'te glutamat varlığında birkaç saat canlı kalmaktadır. AR2'de dekarboksilasyon sonucu glutamat, glutamat- γ -amino bütirik aside (GABA) dönüşür. Bu mekanizma, hücre içi pH'sının korunmasını sağlar. Glutamat dekarboksilasyonundan *gadA*, *gadB* ve *gadC* olmak üzere üç gen sorumludur. Düşük pH'lara karşı en yüksek korumayı sağlayan sistem AR2'dir. Glukoz içeren ortamda durma fazında gerçekleşen AR3, arjinin katkılı minimum ortamlarda, AR4 ise daha az miktarda lisin içeren pH 2,0-2,5'e sahip ortamlarda hücrelerin birkaç saat canlı kalmasını sağlamaktadır. *E. coli*'de en yaygın olarak tespit edilen aminoasit dekarboksilaz sistemi olan AR2, *S. Typhimurium*'da saptanamamıştır. AR3 sisteminin *E. coli* ve *S. Typhimurium*'da bulunduğu, bu sistemin *E. coli*'de yalnızca AR sistemine katkı sağladığı belirlenmiştir. *E. coli*'nin asit direncinden arjinin dekarboksilaz (*adiA*) ve arjinin-agmatin taşıyıcılarının (*adiC*) sorumlu olduğu tespit edilmiştir. AR4 sisteminin ise *E. coli*'de bulunmadığı fakat *S. Typhimurium*'da saptandığı belirtilmiştir (Gorden ve Small 1993, Waterman ve Small 1998, Kieboom ve Abee 2006).

E. coli O157:H7 hücrelerini asetik, bütirik ve propiyonik asit gibi uçucu organik asitlere karşı etkin bir şekilde koruyan sistemlerin arjinin ve glutamat bağımlı sistemler olduğu, oksidatif sistemin ise daha az etkili olduğu belirtilmiştir. Alternatif sigma faktör *rpoS*'nin oksidatif asit stresi için gerekli olduğu fakat arjinin ve glutamat bağımlı asit direnç sistemi için kısmen gerektiği belirlenmiştir. Arjinin dekarboksilaz sistemi (*adi* ve regülatörleri *cysB* ve *adiY*), arjinin bağımlı asit direncinden sorumludur (Lin vd. 1996, Choi vd. 2000).

Sıcaklık ve asit gibi çevresel stres koşullarına karşı durma fazı hücrelerinin direnç artışında sigma faktör regülasyonu (*rpoS*) rol oynar. Enterohemorajik *E. coli* suşları arasında sıklıkla *rpoS* mutasyonu görülmektedir. *Shigella flexneri*, *Salmonella* ve *E. coli*

O157:H7 gibi bazı gıda kaynaklı patojenlerin yaşama oranı üzerinde *rpoS* faktörünün anahtar rol oynadığı ifade edilmiştir. *S. flexneri*, *Salmonella* ve diyarejenik *E. coli*'nin asit direnç sistemlerinden biri olan glukoz bağımlı oksidatif yol, aerobik gelişme koşullarında meydana gelmekte ve *rpoS* tarafından regüle edilmektedir. Bu direnç sistemi, hücreleri pH 3,0'ın üzerindeki asidik streslerden korur. Glutamat bağımlı asit direnç sistemi ise pH 3,0'ın altındaki asidik streslerden hücreleri korumaktadır (Bhagwat vd. 2006, Mao vd. 2006).

Heyde ve Portalier (1990), *E. coli* O157:H7'nin bulunduğu ortam pH'sının 6,9'dan 4,3'e düşmesi durumunda en az 16 polipeptidin sentezlendiğini bulmuştur. Bunlardan 7 tanesi asit şoku proteini olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerin indüksiyonunu *rpoS* faktörü düzenlemektedir.

E. coli ve *Salmonella*'da asit koşullar tarafından indüklenen proteinler, hücre zarı proteinleri ile sıcak şok proteinleri olan *GroEL* ve *DnaK*'dır (Hickey ve Hirshfield 1990, O'Driscoll vd. 1996).

Hengge-Aronis (1999), *E. coli*'de çeşitli stres koşullarına karşı yanıt sağlayan regülatör mekanizmanın olduğu belirtilmiştir. Farklı stres koşulları altındaki *E. coli*'de tespit edilen σ^{3S} (*rpoS*) ve σ^{70} (*rpoD*) sigma alt ünitelerinden oluşan RNA polimeraz enziminin varlığı saptanmıştır. Bu sigma faktörler farklı genler tarafından kontrol edilmektedir. *rpoS* geni, durma fazı gen ekspresyonu için regülatördür. Bu gen yalnızca durma fazında ya da stres koşulları altındayken belirlenmiştir.

Lin vd. (1996), enterohemorajik *E. coli*'nin asit direnç mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, asitle indüklenen oksidatif sistem, asitle indüklenen arjinin bağımlı sistem ve asitle indüklenen glutamat bağımlı sistemlerin varlığı test edilmiştir. Bu sistemler, mide (pH 1,0-3,0) ve bağırsak (pH 4,5-7,0) ortamındaki asit stresinden *E. coli* O157:H7'yi korumaktadır. Bu sistemler, bir kez indüklendikten sonra 4 °C'daki soğuk depoda uzun süre (28 gün) aktif kalmakta ve bu bulgu özellikle gıda endüstrisi için önem taşımaktadır.

2.1.2.2 *L. monocytogenes*'in asit tolerans yanıtı

L. monocytogenes'in asidik gıdalarda, mide sıvısında ve makrofaj fagozomlarındaki düşük pH'larda yaşaması stres adaptasyon mekanizması tarafından sağlanmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlilerinden biri pH homeostasis sistemidir. Asit koşullara maruz kalan hücrelerde, asit tolerans yanıtı sırasında bazı değişimler olmaktadır. Ölümcül ve ölümcül olmayan asidik koşullara maruz bırakılan hücrelerde protein sentezi gerçekleşmektedir. Mikroorganizmaların sitoplazma pH'sı, hücre membranından proton taşınımını gerçekleştiren pH homeostasis mekanizma tarafından korunmaktadır. Aerobik mikroorganizmalarda, H^+ 'nın aktif taşınımı, solunum zincirindeki elektron taşıma sistemi ile gerçekleşmektedir. Anaerobik mikroorganizmalarda, H^+ taşınımı, ATP hidrolizinden gelen enerjiyi kullanarak H^+ -ATPaz molekülleri vasıtasıyla gerçekleşir. Fakültatif anaerobik olan *L. monocytogenes*, pH homeostasis için her iki sistemi de kullanmaktadır. ATPaz, ATP'yi kullanarak, hücre zarı boyunca protonların yer değiştirmesi için kanal görevi yapan alt birimli bir enzimdir. Bu enzim, oldukça iyi bir şekilde korunmuştur ve *E. coli*'de yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Enzimin F_1 kısmı beş alt birimden α_3 , β_3 , γ , σ , ϵ oluşur, F_0 kısmı ise a , b_2 ve c_{10} birimlerinden oluşmaktadır. ATPaz'ın, *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonu sırasında rol oynadığı belirtilmektedir (Phan-Thanh ve Mahouin 1999, Cotter vd. 2000, Hill vd. 2002, Gandhi ve Chikindas 2007).

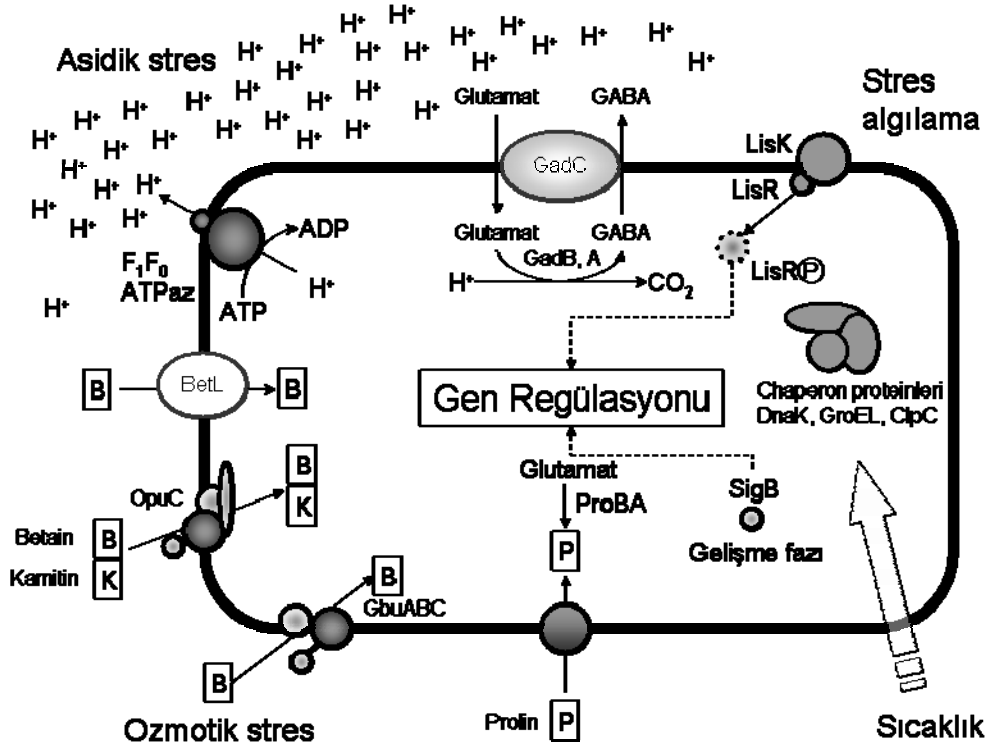
L. monocytogenes ölümcül (asit stres) ve ölümcül olmayan (asit adaptasyon) asit koşullara maruz bırakıldığında protein sentezi gerçekleşmektedir. Ölümcül pH'ya maruz kalan hücrelerde daha fazla protein sentezlenmesine rağmen, bu proteinlerin büyük çoğunluğunun her iki pH koşulunda da ortak olduğu belirtilmiştir. *L. monocytogenes*'in düşük sıcaklıkta geliştirilmesi sırasında sentezi artan *GroEL* proteininin asit stresi altında da indüklendiği belirlenmiştir. Asit stresi sırasında tespit edilen diğer proteinler ATP sentaz ve transkripsiyonal regülatörlerdir (Gandhi ve Chikindas 2007).

Asitlik arttıkça sentezlenen proteinler de artmakta, pH 3,5'te 47 protein ve pH 5,5'te 37 protein sentezlenmekte olup, bu proteinlerden 23'ünün ortak olduğu saptanmıştır. Asidik koşullarda sentezlenen bu proteinler nötral pH'larda sentezlenmemektedir. Asit stres

sırasında sentezlenen proteinler, ATP sentaz, thioeredoksin redüktaz, sigma H faktör, çaperonin, alkol dehidrogenaz ve *GroEL*'dir (Phan-Thanh ve Mahouin 1999, Phan-Thanh vd. 2000).

L. monocytogenes'in asit strese yaşamasını sağlayan diğer bir sistem glutamat dekarboksilazdır (GAD). GAD sistemi *gadA*, *gadB* ve *gadC* olmak üzere 3 gen içermektedir. *gadA* ve *gadB* glutamat dekarboksilazlarını kodlarken *gadC* geni glutamat/ γ -aminobütirat taşıyıcılarını kodlamaktadır. Bu sistemle bağlantılı genler *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio* ve *Lactobacillus lactis* türlerinde de identifiye edilmiştir. Bu sistemin varlığı *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* ve *Lactobacillus brevis*'te biyokimyasal olarak tespit edilmiştir. GAD sisteminin asit dirence nasıl katkı sağladığı bir modelle açıklanmıştır. Spesifik enzimler tarafından glutamat parçalanarak intraselüler proton tüketimi meydana gelir. Bu reaksiyon ürünü glutamat- γ -aminobütirat (GABA) taşıyıcılar aracılığıyla hücreden uzaklaştırılır. Proton kaybı ile sitoplazma pH'sı artar ve ekstraselüler pH'da hafif bir artış olur. Ekstraselüler glutamat daha alkali olan GABA dönüşür. GAD sistem fonksiyonu, *L. monocytogenes*'in aside direnç kazanmasında ve mide ortamından başarıyla geçip enfeksiyon oluşturması açısından hayati öneme sahiptir. Glutamatça zengin asitli gıdalarda, *L. monocytogenes*'in canlı kalmasında GAD sisteminin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Şekil 2.3) (Conte vd. 2002, Hill vd. 2002, Wemekamp-Kamphuis vd. 2004, Gandhi ve Chikindas 2007).

L. monocytogenes'te, stres yanıt genlerinin regülasyonuna katılan çevrimler hakkında nispeten daha az şey bilinmektedir. Son zamanlarda, *L. monocytogenes*'te, alternatif sigma faktörü σ^B tanımlanmıştır. Bu sigma faktörü, stres yanıt proteinlerinin çoğunun sentezini regüle etmektedir. *L. monocytogenes*'in tuz toleransı ile ilgili glisin betain taşıma sistemi olan *BetL*, σ^B -bağımlı promotor bağlanma bölgesine sahiptir (Gahan ve Hill 1999).



Şekil 2.3 Stres yanıtında rol oynayan sistemler (Hill vd. 2002)

L. monocytogenes'in farklı gelişme fazlarında σ^B -bağımlı ve σ^B -bağımsız asit direnç mekanizmalarının varlığı tespit edilmiştir. İlimli asit koşullara maruz bırakılan logaritmik faz *L. monocytogenes* hücrelerinin hayatta kalmaları ve mide sıvısına olan direnç artışları kısmen σ^B 'ye bağlıdır. Asit stresi altında, *L. monocytogenes*'in hayatta kalışı üzerinde σ^B 'nin rolü bulunmaktadır. σ^B faktörü aynı zamanda, virülens gen ekspresyonunu da regüle etmektedir (Ferreira vd. 2003, Sue vd. 2004, Gandhi ve Chikindas 2007).

İki komponentli sistem olarak tanımlanan *LisRK*, *L. monocytogenes*'in asit direncinin regülasyonunda önemli bir role sahiptir (Gahan ve Hill 1999, Merrell ve Camili 2002). *L. monocytogenes*'te yanıt regülatörü ve histidin kinazı kodlayan *lisR* ve *lisK*'leri içeren iki komponentli regülatör sistemin varlığı tespit edilmiştir. Bu sistem hücre zarı ile ilişkili histidin kinaz vasıtasıyla, düşük pH, oksidatif ve etanol stresi gibi çevredeki değişiklikleri algılayarak hücrenin yanıt vermesini sağlamaktadır (Gandhi ve Chikindas 2007).

Asit adaptasyonu ile düz zincirli yağ asitleri C14:0 ve C16:0 artış gösterirken, C18:0 düzeyi azalmıştır. *L. monocytogenes*'in nisin dirençli mutantlarında C14:0 düzeyinde artış tespit edilmiştir (Hill vd. 2002).

2.1.3 Adaptasyonda etkili olan faktörler

Gıda patojenlerinin aside tolerans kazanmasında bakteri türleri, aynı türlerde suş farklılıkları, bakterinin üreme dönemi, ortamın pH'sı, ortamda bulunan asidin cinsi, ortamın içeriği gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Buchanan ve Edelson 1999). *E. coli* O157:H7'nin asit toleransı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, asit tolerans yanıtında bakteri türü, gelişme dönemi, gıdanın çeşidi ve depolama sıcaklığının etkili olduğu belirlenmiştir (Schurman 2001).

Samelis vd. (2003), *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'u %1 glukoz içeren ve içermeyen TSB besiyerinde 10 °C'da 14 gün, 30 °C'da 24 saat inkübe ederek aside adapte etmişlerdir. 10 °C'da gerçekleştirilen asit adaptasyonunda asit tolerans yanıtı, 30 °C'da gerçekleştirilen adaptasyona kıyasla azalmıştır. Asit adaptasyon uygulaması sırasındaki depolama sıcaklığının, adaptasyon üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır.

Adaptasyon süresi ve pH düzeylerinin tolerans üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin pH 4,5'e 2 saat maruz bırakılmasıyla pH 3,0'daki asit toleransında maksimum düzeyde artış sağlanmıştır. Adaptasyon süresi, pH ve asit uygulamasından sonraki koşulların, asit toleransında etkili olduğu görülmüştür (Tosun ve Gönül 2005).

Cheng vd. (2003), *E. coli* O157:H7'nin asit toleransı üzerinde asit koşulların ve adaptasyon süresinin etkileri araştırılmıştır. *E. coli* O157:H7'nin 3 suşu pH 5,0'da 1, 2, 3, 4 ve 6 saat süreyle tutulmuştur. Aside adapte edilen hücrelerin asit toleransı, pH 3,0; 4,0 ve 5,0'da belirlenmiştir. pH'ların ayarlanması amacıyla HCl, asetik, laktik ve propiyonik asit kullanılmıştır. Araştırma sonunda, asit adaptasyonu ile asit toleransının

arttığı, adaptasyon süresine ve asit çeşidine bağlı olarak artışın gerçekleştiği belirlenmiştir. En yüksek asit toleransı dört saatlik adaptasyon süresi sonunda elde edilmiştir. HCl adaptasyonu ile organik asitlere olan dirençte de artış görülmüştür. Asetik asit varlığında, aside tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan bakteri sayısı sırasıyla 0,36 ve 1,00 log kob/mL, laktik asit varlığında ise 1,70 ve 3,47 log kob/mL düzeyinde azalmıştır.

Asit şoku ve aside adaptasyon işleminin *E. coli* O157:H7'nin aside tolerans kazanması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Durma fazı hücreleri pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te tutulmuştur. Daha sonra asit şokuna bırakılan hücreler 1, 2, 3 ve 4 saat, aside adapte edilen hücreler ise 18 saat inkübe edilmiştir. Asit şoku ve aside adapte edilen hücrelerin asit toleransı pH 2,5-3,0'da belirlenmiştir. Asit şoku *E. coli* O157:H7'nin aside olan toleransını arttırırken, asit adaptasyonu asit toleransında artış sağlamamıştır. Aside en yüksek tolerans pH 4,5'te 2 saat asit şokuna maruz kalan kültürde elde edilmiştir. Sonuçlar *E. coli*'nin pH'sı 4,5-5,5 olan asidik ortamlara kısa bir süre maruz kalması durumunda aside tolerans kazandığını göstermiştir (Tosun ve Gönül 2005).

Koutsoumanis ve Sofos (2004) tarafından yürütülen bir çalışmada, 4,0 ile 6,0 arasındaki pH'lara 90 dakika süreyle maruz bırakılan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un pH'sı 3,5 olan TSB besiyerindeki yaşama düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda aside tolerans kazandırma ile patojenlerin ölümcül asit koşullardan korunduğu ve aside karşı oluşan koruyuculuğun pH'ya bağımlı olduğu saptanmıştır. *E. coli* O157:H7'de 4,0 ile 5,5 arasındaki pH'lara muameleden sonra asit direncinin arttığı ve pH uygulamalarının etkilerinin patojenler arasında farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. *L. monocytogenes*'te 5,0 ile 6,0 arasındaki pH'larda, *S. Typhimurium*'da ise 4,0 ile 5,0 arasındaki pH'larda asit direnci artmıştır. Aside en yüksek tolerans, *E. coli* O157:H7'de pH 5,0'da, *L. monocytogenes*'te pH 5,5'te ve *S. Typhimurium*'da pH 4,5'te gerçekleşmiştir.

Ryu ve Beuchat (1998) tarafından, *E. coli* O157:H7'nin, asit şok, asit adapte ve kontrol hücrelerinin laktik asit ve asetik asit ile asitlendirilmiş TSB besiyerindeki gelişme özellikleri incelenmiştir. Asetik asit denemelerinde (pH 3,4), bu üç hücre çeşidi aynı

davranışı sergilemiştir. Laktik asit denemelerinde (pH 3,9) ise, asit adapte ve asit şok hücrelerinin sayısının kontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu, asit adapte hücrelerin asidik koşulları asit şok hücrelerine kıyasla daha iyi tolere edebildiği saptanmıştır. Asit tolerans yanıtının asit çeşidi, pH ve hücre çeşidine bağlı olduğu ifade edilmiştir.

V. vulnificus'un üç suşu HCl, sitrik ve asetik asit (pH 5,5) kullanılarak aside adapte edilmiştir. Kontrol ve aside adapte edilen hücrelerin pH 3,5'teki asit toleransları belirlenmiştir. HCl kullanımında pH 5,0'da 5 ve 10 saatlik adaptasyon direnç artışına neden olurken, 1 ve 3 saatlik adaptasyon direnç artışı sağlamamıştır. Sitrik asit adaptasyonu ile sitrik aside olan direncin arttığı, asetik asit adaptasyonunun ise direnç artışına neden olmadığı saptanmıştır. En yüksek asit tolerans yanıtının, HCl kullanımında gerçekleştiği rapor edilmiştir. HCl ve sitrik asitte gerçekleştirilen asit adaptasyonunda bakteri suşu, adaptasyon süresi ve asit çeşidinin etkili olduğu görülmüştür. Asit adaptasyonu ile dondurma-çözdürmeye olan direnç artmış ve soğukta depolama sırasında yaşama oranı artış göstermiştir (Bang ve Drake 2005).

Greenacre vd. (2003) tarafından yürütülen çalışmada, adaptasyon süresinin, hücrelerin sitoplazma pH'larını koruyabilme yetenekleriyle bağlantılı olduğu anlaşılmıştır. Hücrelerin sitoplazma pH'larını koruyarak ılımlı asit koşullara adapte oldukları ve uzun adaptasyon süresinin adaptasyon sağlamadığı belirlenmiştir. Kritik zaman sonrasında hücre sitoplazma pH'sını korumakta başarısız olmakta ve hücreler asidin öldürücü etkilerine karşı duyarlı hale gelmektedir. Kullanılan asit çeşidine bağlı olarak adaptasyon süresi farklılık göstermekte olup, asetik asit kullanılarak gerçekleştirilen adaptasyonda *L. monocytogenes*'in optimum asit toleransı 3 saatlik adaptasyondan sonra, laktik asit kullanılarak gerçekleştirilen adaptasyonda ise optimum tolerans 2 saatlik adaptasyon sonrasında gerçekleşmiştir. Ayrıca asetik asit kullanımında hücre içi pH'sı laktik aside göre daha hızlı azalmıştır.

Koutsoumanis vd. (2003) tarafından, *L. monocytogenes*'te pH 4,0 ile 7,0 arasında gerçekleştirilen asit adaptasyon uygulamasında, pH 5,0; 5,5 ve 6,0'da 90 dakikalık

adaptasyon sonunda asit direnci artarken, pH 4,0; 4,5 ve 7,0'da gerçekleştirilen adaptasyon asit direncinde artışa neden olmamıştır.

Caggia vd. (2009) tarafından yürütülen çalışmada, pH'sı 5,7'ye sahip ortamda 3 saatlik adaptasyon uygulamasına tabi tutulan *L. monocytogenes*'in laktik asitle pH'sı 3,7'ye ayarlanmış ortama olan direncinin arttığı tespit edilmiştir.

Phan-Thanh vd. (2000), asit stresinden önce *L. monocytogenes* EGD suşu pH 4,8'de, LO28 suşu pH 5,5'te birkaç saat aside adapte edilmiştir. En yüksek asit toleransı 2 ve 3 saatlik adaptasyonda gerçekleşmiş, adaptasyon süresi 24 saate uzatıldığında ise asit toleransı azalmıştır. Aside adapte edilen kültürler, 4 °C'da muhafaza edildiğinde asit toleransı birkaç hafta devam etmiştir.

Lou ve Yousef (1997)'un yaptıkları bir çalışmada, *L. monocytogenes*'in pH 4,5 ve pH 5,0'da 1 saatlik adaptasyon sonrasında, pH 3,5'te yaşama düzeyleri belirlenmiştir. Bir saatlik adaptasyon uygulaması ölümcül düzeydeki aside olan direnci arttırmıştır. En yüksek asit direnci pH 5,0'da aside adapte edilen hücrelerde saptanmıştır.

Faleiro vd. (2003) tarafından, asidik ve nötral gıdalardan izole edilen farklı *L. monocytogenes* suşları üzerinde yürütülen araştırmada, düşük pH ve yüksek NaCl'ye olan duyarlılığın suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Laktik asit kullanılarak pH 5,5'e ayarlanmış ortamda 1, 2 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen asit adaptasyonunda en yüksek asit direnci en az 2 saatlik adaptasyonda gerçekleşmiştir. Asit adaptasyonu, suşlar arasında farklılık göstermiş, peynir izolatlarında 2 saatlik, et izolatlarında ise 4 saatlik adaptasyon sonunda en yüksek düzeyde asit direnci kazanılmıştır.

E. coli O157:H7'nin asit toleransı, gelişme fazına ve hücre yoğunluğuna bağlıdır (Datta ve Benjamin 1997). Durma fazı kültürlerinin asit toleransı, logaritmik faz kültürlerinden daha yüksektir (Jordan ve Davies 2001). pH'sı 2,5 olan ortamda, *E. coli* O157:H7'nin

durma fazı hücreleri 2 saat, logaritmik faz hücreleri ise yarım saat içinde canlılıklarını yitirmiştir (Jonge vd. 2003).

L. monocytogenes'in asidik pH'ya olan direnci, gelişme ortamının bileşimine, bakteri suşuna, gelişme fazına ve kullanılan asit çeşidine bağlıdır. *L. monocytogenes*'in yaşama oranı, HCl varlığında %96, asetik asit varlığında ise %31 olarak bulunmuştur (Phan-Thanh vd. 2000). Durma fazı hücreleri doğal olarak pH değişimlerine (pH 3,5) karşı dirençlidir. Fakat logaritmik faz hücrelerin asit toleransının indüksiyonu için pH 5,5'te adaptasyon işleminin gerçekleşmesi gereklidir (O'Driscoll vd. 1996).

Logaritmik fazdaki *L. monocytogenes*'in, laktik asitle pH'sı 5,1'e ayarlanmış ortamda bir saatlik adaptasyon sonrasında, pH 3,5'e olan dirençleri artmıştır. pH 3,5'te inkübasyonun ikinci saatinde, logaritmik fazda aside tolerans kazanmış ve kazanmamış hücreler ile durma fazında aside tolerans kazanmış hücrelerin canlı kalma düzeyleri sırasıyla % 80; % 20 ve % 70 olarak hesaplanmıştır (Cataldo vd. 2007).

Dlamini ve Buys (2009), %1 glukoz içeren TSB besiyerinde 18 saat süreyle aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 UT10 ve ATCC 25922 suşlarının, pH'sı 4,5 ve 2,5'e ayarlanmış Brain Heart Infusion (BHI) besiyerindeki canlı kalma düzeylerini araştırmışlardır. Asit adaptasyonu ile pH 4,5 ve pH 2,5'e olan direncin arttığı ve direnç artışının suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Vialette vd. (2003), *L. monocytogenes*'in klinik izolatlarının asit ve ozmotik stres gibi olumsuz koşullara adaptasyon yeteneklerinin gıda izolatlarına kıyasla daha yüksek olduğu rapor etmişlerdir. Berk vd. (2005) ise, insan ve gıda izolatu *S. Typhimurium*'un asit adaptasyonuna yönelik olarak yürüttükleri çalışmalarında, insanlardan izole edilen suşların asit direncinin daha yüksek olduğu ve adaptasyon üzerinde suş farklılıklarının önemli olduğunu göstermişlerdir.

Goodson ve Rowbury (1989)'a göre, pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin, pH'sı 3,5 olan, asetik, laktik, benzoik, propiyonik ve sorbik asit içeren besiyerindeki canlı kalma düzeyi artış göstermiştir.

Farklı organik ve inorganik asitlerin bakterisidal ve bakteriostatik etkileri bilinmektedir. Gıda patojenlerine karşı organik asitler, inorganik asitlerden daha etkilidir. Bu etki, hücre içine diffüzyon yeteneklerinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Asetik asit gibi düşük moleküler ağırlıktaki organik asitler, sitrik asit gibi yüksek moleküler ağırlıktaki organik asitlerden daha yüksek inhibitör etkiye sahiptir (Deng vd. 1999, Phan-Thanh vd. 2000, Buchanan vd. 2004, Breidt vd. 2004, Bang ve Drake 2005).

Asitlerin inhibitör etkileri disosiasyon konstantı (pKa) ile korelasyon halindedir. Disosiyasyon formunda olmayan zayıf asitlerin hücre zarından geçişi daha fazladır. Asitler arasında yapılan testlerde HCl'nin sulu ortamlarda tamamen disosiyasyon olduğu, pH 5,4'te en yüksek disosiyasyon olmayan asit konsantrasyonuna sahip asidin asetik asit (pKa 4,76) olduğu, laktik asidin (pKa 3,86) ise en düşük disosiyasyon konsantrasyonuna sahip olduğu belirtilmiştir. En yüksek pKa değerine sahip olan asetik asidin *L. monocytogenes* üzerindeki inhibitör etkisi, HCl'den daha yüksektir. En yüksek inhibitör etkiye sahip asetik asidin bu özelliği hücre zarından geçiş yeteneği ile açıklanmaktadır. Laktik asit daha düşük inhibitör etkiye sahip olup, hücre zarına etkili tutunamamaktadır. *L. monocytogenes* üzerindeki inhibitör etkinin asetik asit>laktik asit>HCl şeklinde olduğu belirlenmiştir (Vasseur vd. 1999, Gravesen vd. 2004, Bang ve Drake 2005).

Sorelles vd. (1989), *L. monocytogenes* üzerinde organik asitlerin bakteriyostatik etkilerinin asetik asit>laktik asit>sitrik asit şeklinde olduğu belirtilmiştir. Ryu vd. (1999), asitlerin *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, bakteriyostatik etkinin asetik asit>laktik asit>sitrik asit şeklinde olduğu, Bang ve Drake (2005) tarafından yürütülen çalışmada ise, *V. vulnificus* üzerinde asetik asidin sitrik asitten daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Bir başka araştırmada %1,25 glukoz içeren TSB besiyerinde 18 saat geliştirilerek aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin, asetik, sitrik ve malik asit kullanılarak farklı pH'lara

ayarlanmış besiyerindeki yaşama düzeyleri belirlenmiştir (Deng vd. 1999). Araştırma sonunda, organik asitlerin *E. coli* O157:H7 üzerindeki inhibitör etkisi, asetik>laktik>malik asit şeklinde bulunmuştur.

Leyer ve Johnson (1992) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, HCl ile pH 5,8'de aside tolerans kazandırılan *S. Typhimurium* hücrelerinin asetik, propiyonik ve laktik asit gibi organik asitlerdeki yaşama düzeyleri tespit edilmiştir. Asitlerin hepsinde aside tolerans kazanan hücrelerin yaşama oranı aside tolerans kazanmayan hücrelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Laktik asidin en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu, bunu asetik ve propiyonik asidin izlediği belirtilmiştir. Aside tolerans kazanmış *S. Typhimurium*, peynirin fermentasyonu aşamasında, aside tolerans kazanmamış kültüre göre daha uzun süre canlı kalmıştır.

Buchanan vd. (2004) tarafından, farklı asit çeşitlerinin (asetik, laktik, sitrik, malik ve HCl) *E. coli* O157:H7'nin asit toleransı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada, en yüksek inhibitör etki laktik asitte, en düşük inhibitör etki ise HCl kullanımında gerçekleşmiştir.

Buchanan ve Edelson (1999) tarafından, HCl, asetik, laktik, malik ve sitrik asidin *E. coli* O157:H7 üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. En yüksek inhibitör etki laktik asitte, en düşük inhibitör etki HCl'de elde edilmiş olup, asetik, sitrik ve malik aside olan duyarlılık ise suşlar arasında farklılık göstermiştir.

2.1.4 Çapraz direnç

Çapraz direnç, bakterinin karşılaştığı strese adapte olurken aynı anda diğer streslere de adapte olarak direnç kazanması olarak tanımlanır. *E. coli* O157:H7'de çevresel streslere direnç sağlayan en önemli gen *rpoS* genidir. Birçok araştırmacı, *rpoS* geninin regüle ettiği proteinlerin açlıkla indüklendiğini, sıcaklık ve asit de dahil olmak üzere farklı streslere karşı çapraz direnç sağladığını belirtmiştir (Arnold ve Kaspar 1995, Cheville vd. 1996).

rpoS geni sıcak şok, ozmotik stres, oksidatif stres, açlık, asit ve etanol gibi genel stres yanıtlarını da içeren 35'ten fazla geni kontrol etmektedir. Stres hücreleri ve durma fazı hücrelerinde daha yüksek direncin oluşmasında rol oynayan alternatif sigma faktörü, *rpoS* geni tarafından kodlanmaktadır (Farewell vd. 1998).

Asit adaptasyonu sıcaklık, tuzluluk, laktoperoksidaz sistem aktivasyonu gibi diğer çevresel stres ajanlarına karşı da çapraz direnç sağlar. *E. coli* O157:H7'de subletal sıcaklık uygulamaların, bakterinin aside olan toleransını artırdığı bilinmektedir. Bu çapraz direnç, sıcaklık ve asit şoku proteinlerinin sentezlenmesi ile meydana gelir. Bu özellik, hafif ısıtma işlemi uygulandıktan sonra asidik koruyucu kullanılan gıdalarda *E. coli* O157:H7'nin uzun süre canlı kalmasını sağlayabilir (Leyer vd. 1995).

Üç farklı *E. coli* O157:H7 suşunun stres toleransı üzerinde, asit adaptasyonunun etkisi araştırılmıştır. Hücreler pH 5,0'da 4 saat aside adapte edilmiş ve hücrelerin termal toleransı (52 °C'da), NaCl, safra tuzu ve etanol varlığında yaşama oranları incelenmiştir. Asit adaptasyonu ile termal ve NaCl toleransı artış göstermiştir. Asit adaptasyonu safra tuzuna tolerans üzerinde etkili olmamıştır (Azizoğlu 2005).

Bazı dondurulmuş ürünlerde, soğuk şokuna maruz kalan *E. coli* O157:H7'nin soğuk şokuna maruz kalmayan hücrelere göre daha uzun süre canlı kaldığı görülmüştür. Ancak önceden pH 5,0'da aside adapte edilen hücrelerde bu etki oluşmamaktadır. Ayrıca soğuk stresi *E. coli* O157:H7'nin sıcaklığa olan direncini düşürürken, donma- çözünme direnci üzerinde artışa neden olmuştur. Donma- çözünme direnci ise *E. coli* O157:H7'nin aside adapte olması durumunda artmaktadır. Açlık stresi de *E. coli* O157:H7'nin donma- çözünme direncini arttırmıştır (Tosun 2003).

pH 5,5'te 2 saat aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in asit toleransının arttığı tespit edilmiştir. Asit toleransı, *L. monocytogenes*'in sıcak şok (52 °C), ozmotik şok (%25-30 NaCl) ve alkol (%15) stresine karşı çapraz direncini arttırmıştır. Ayrıca 50 °C'da 45 dakika sıcağa adapte edilen hücrelerin asit direncinin arttığı da belirlenmiştir (Phan-Thanh vd. 2000, O'Driscoll vd. 1996).

Laktik asit kullanılarak pH'sı 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde bir saat aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in modifiye atmosferde paketlenmiş sebzelerde yaşama oranı artmıştır. Asit adapte *L. monocytogenes*'in yüksek CO₂ (%25-30) atmosferine olan direnci de artış göstermiştir (Francis ve O'Beirne 2001).

Üç farklı *L. monocytogenes* suşu farklı asitlerle (asetik, sitrik, laktik) pH'sı 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 1 ve 4 saat süreyle adaptasyona bırakılmıştır. Asit adapte hücrelere düşük düzeyde gama radyasyonu (0,59-0,72 kGy) uygulanmıştır. Araştırma sonunda radyasyona karşı en yüksek direnç, asetik asitte 1 saat adapte edilen hücrelerde tespit edilmiştir (Foley vd. 2005).

L. monocytogenes'in asit adaptasyonu sıcaklık, etanol, oksidatif ve ozmotik streslere ve nisin gibi bakteriyosinlere karşı çapraz direnç sağlamaktadır. Adaptif asit toleransının çapraz direnci; mide sıvısı, safra ve refakatçi bağırsak florası, fagozomdaki oksidatif ürünler ve ince bağırsaktaki organik asit gibi konakçıdaki değişimlerden bakterilerin etkilenmeden yaşamasına katkıda bulunarak hastalık yapma şansının artmasına neden olmaktadır (Lou ve Yousef 1997).

Düşük pH koşullarına adapte edilen *L. monocytogenes* hücreleri adapte edilmeyenlere kıyasla asidik koşullarda daha yüksek yaşama oranına sahiptir. Yüksek ozmotik koşullara adaptasyon *L. monocytogenes*'in termotoleransını artırmaktadır. Düşük sıcaklıklara adapte edilen *L. monocytogenes*'in 10 °C sıcaklıktaki gelişiminde artış tespit edilmiştir. Stres koşullarına adaptasyon *L. monocytogenes*'in virulensinde de artışa neden olmuş ve adapte hücreler yapay mide ortamında daha uzun süre canlılığını korumuştur (Bolton ve Frank 1999).

Farklı kaynaklardan izole edilen *L. monocytogenes* suşları, %10 NaCl (1,5 saat), pH 5,0 (1,0-1,5 saat) ve 46 °C sıcaklık (0,5-1,5 saat) stresine tek tek ya da bu streslerin kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır. En yüksek termal tolerans, kombine stres uygulamaları sonucunda elde edilmiştir (Skandamis vd. 2008).

Aside adapte edilmiş ve edilmemiş *L. monocytogenes*'in inoküle edildiği taze sığır etleri, 30 saniye süreyle sıcak suya (75 °C ve 55 °C) ve 55 °C sıcaklığa sahip olan %2'lik asetik ve laktik asit solüsyonlarına daldırılmıştır. Asit adaptasyonu, *L. monocytogenes*'in bu uygulamalara olan direncinde artışa neden olmamıştır (Ikeda vd. 2003).

Glukoz içeren ve içermeyen ortamda geliştirilen *L. monocytogenes*'in durma fazı hücreleri, asit stres (pH 4,0 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ve 7,0), ozmotik stres (%10,5 ile %20,5 NaCl) ve sıcak şok (-5; 50 °C) gibi farklı stres koşullarına 90 dakika maruz bırakılmıştır. Ilımlı asit (pH 5,0; 5,5 ve 6,0) uygulaması, patojenin kuvvetli aside (pH 3,5) olan direncini arttırmış, fakat pH 4,0; 4,5 ve 7,0'da gerçekleştirilen adaptasyon asit direncinde artışa neden olmamıştır. Asit stres dışındaki subletal stresler, *L. monocytogenes*'in asit direncini etkilememiştir. Farklı sıcaklıklarda (4, 15 ve 30 °C) ılımlı asit koşullara (pH 5,5) muamele edilen *L. monocytogenes*'in sıcaklık azaldıkça aside olan dirençlerinin azaldığı belirlenmiştir (Koutsoumanis vd. 2003).

L. monocytogenes'in logaritmik faz kültürleri subletal dozdaki etanol (%5), asit (pH 4,5-5,0), H₂O₂ (500 ppm), NaCl (%7) ve sıcak şokuna (45 °C) bir saat maruz bırakılmıştır. Strese adapte edilen hücrelerin ölümcül düzeydeki etanol (%17,5), asit (pH 3,5), H₂O₂ (%0,1), NaCl (%25) varlığında yaşama düzeyleri tespit edilmiştir. Asit ve etanole adapte edilen *L. monocytogenes*'in asit, etanol ve H₂O₂'ye olan direnci artış göstermiştir. Etanol adaptasyonunun %25 NaCl'e olan direnci, H₂O₂, NaCl ve sıcak adaptasyonu ise H₂O₂'ye olan direnci arttırmıştır. *L. monocytogenes*'in farklı streslere adaptasyonundan sonra letal koşullardaki streslere olan dirençlerinin de arttığı belirlenmiştir (Lou ve Yousef 1997).

Sharma vd. (2005) tarafından yürütülen çalışmada, aside adapte edilen ve edilmeyen *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in kavun ve karpuz suyunda desimal indirgeme süresi (D değeri) belirlenmiştir. %1 glukoz içeren TSB besiyerinde 24 saat süre ile aside adapte edilen *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7'nin termal toleransının artmasına rağmen, *L. monocytogenes*'in termal toleransında artış sağlanamamıştır.

Calicioglu vd. (2002), aside adapte edilmiş ve edilmemiş *L. monocytogenes*'in inoküle edildiği sığır etleri, 4 °C'da 24 saat farklı solüsyonlar kullanılarak marine edilmiş ve 60 °C'da 10 saat kurutulmuştur. Adaptasyon uygulamasının *L. monocytogenes*'in kurutma prosesine olan direncini arttırmadığı rapor edilmiştir.

S. Typhimurium'da asit adaptasyonunun, sıcaklık ve hidrojen peroksit şokuna karşı çapraz direnç sağlamadığı ancak polimiksin B, kristal viyole, laktoperoksidaz sistem aktivasyonu ve tuz gibi stres koşullarına karşı çapraz direnç sağladığı belirtilmiştir (Leyer ve Johnson 1993).

S. Typhimurium'un ılımlı asit şartlara maruz bırakılmasının, hücreleri şiddetli asit şokuna karşı koruyan ATY sistemini aktive ettiği bilinmektedir. Bu sistem, tuz ve sıcaklık gibi diğer stres koşullarına karşı çapraz direnç de sağlamaktadır. *S. Typhimurium*'un ATY sistemi üzerine laktik ve asetik asidin etkisi araştırılmıştır. Asit adapte hücreler NaCl ve KCl şokuna maruz bırakılmış ve yaşama oranları belirlenmiştir. Asetik asit adaptasyonu, hücreleri NaCl ve KCl stresine karşı korumuştur. Buna rağmen, laktik asit adaptasyonunun ozmotik stres ajanlarına karşı koruyucu etkisi olmamıştır. HCl'nin teşvik ettiği ATY, tuz ve sıcaklık uygulamalarına karşı direnç sağlarken, H₂O₂ (oksidatif) stresine karşı direnç sağlamamaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerine adaptasyon ile tuza karşı koruyucu yanıt oluşurken, H₂O₂'ye karşı yanıt oluşmamıştır (Greenacre ve Brocklehurst 2006).

Asit ve alkali stres *V. parahaemolyticus*'un sıcaklığa direncini artırmaktadır. Asit adaptasyonunun *E. coli* O157:H7'nin sıcaklık, dondurma ve çözdürmeye direncini arttırdığı belirlenmiştir (Bang ve Drake 2005).

S. Typhimurium, konakçı ortamı dışında aside oldukça duyarlıdır. Bu bakteri, pH 5,8'e ayarlanmış ortamda bir jenerasyon süresi boyunca inkübe edilerek aside adapte edilmiştir. Aside adapte edilen hücrelerin sıcaklık, tuz ve organik asitler gibi farklı streslere karşı tolerans kazanırken, soğuğa karşı çapraz direnç oluşmadığı belirlenmiştir. Aside adapte edilen hücrelerin 50 °C'daki D değeri kontrol hücrelerine göre oldukça

yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar aside adaptasyonun hücrenin birçok farklı strese karşı direncini artırdığını göstermiştir (Tosun ve Gönül 2003).

Singh vd. (2006) tarafından yürütülen çalışmada, 4 °C ve -20 °C'da depolanan sığır etindeki asit adapte *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella*'nın termal toleransları üzerine depolama sıcaklığının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla %1 glukoz içeren TSB'de geliştirilerek asidik koşullara (pH 4,6) adapte edilen hücreler sığır etlerine inoküle edilmiştir. 4 °C'da depolanan örnekler 1, 7, 14, 21 ve 28. günde, -20 °C'da depolanan örnekler 1, 30, 60, 90 ve 120. günde, 62 ve 65 °C sıcaklığa maruz bırakılarak D değeri belirlenmiştir. 4 °C'da depolanan aside adapte edilmeyen *E. coli* O157:H7'de D₆₂ değeri 21. ve 28. günde, -20 °C'da depolananlarda 90. ve 120. günde daha yüksek bulunmuştur. 4 °C'da depolanan aside adapte edilmeyen *Salmonella*'da D₆₂ değerinin 21. ve 28. günde, 4 °C'da depolanan asit adapte *Salmonella*'da 28. günde daha yüksek olduğu görülmüştür. Asit adapte *Salmonella*'da -20 °C'da depolananda D₆₂ değeri 30, 60 ve 90. günde daha yüksektir. Aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* ve *Salmonella*'larda D₆₅ değerleri arasında her iki sıcaklıkta depolamada önemli bir fark tespit edilmemiştir. Bu bulgular gıda kaynaklı patojenlerin asit adaptasyonunun daha düşük pişirme sıcaklığı gibi sıcaklık uygulamasına karşı belirli bir koruma sağladığını, daha yüksek sıcaklık uygulamasına karşı aside adapte edilen ve edilmeyen türlerin duyarlılıkları arasında farklılık olmadığını göstermiştir.

Arnold ve Kaspar (1995) tarafından yürütülen çalışmada, 4 °C'da *E. coli* O157:H7'de asit toleransının oluşmadığı belirlenmişve *E. coli* O157:H7'de, 8 °C'ın altındaki sıcaklıklarda asit toleransı için gerekli proteinlerin sentezinin inhibe edildiği rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada, ozmotik stres ile düşük sıcaklık ve yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan *L. monocytogenes*'in asit stresine olan direncinin artmadığı rapor edilmiştir (Koutsoumanis vd. 2003). Gıda üretimi sırasında, bakterilerin stres koşullarına adaptasyon yetenekleri, sıcaklık, pH ve tuz gibi stres faktörlerinin sayısına ve gelişme koşullarına bağlıdır. *L. monocytogenes*'in % 10,5 NaCl varlığında pH 5,5'e maruz

bırakılması, bakterinin asit direncinde azalmaya neden olmuş, fakat direnç azalması kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeyde kalmıştır.

2.1.5 Aside tolerans kazanmanın patojenitedeki rolü

Gıda kaynaklı hastalıklara yol açan bakteriyel patojenler, konakçı bağışıklık sisteminden kaçmak ve konak hücrede yerleşmek için karmaşık birçok sistem geliştirmişlerdir. Örneğin *L. monocytogenes*, hücre işgalini kolaylaştırmak, konakçı hücrenin fagozomlarından kaçmak ve komşu hücrelere yayılmak için özel enfeksiyon yapıcı faktörler kullanır. *S. Typhimurium*, hedef hücrelerin ele geçirilmesine imkân sağlamak için enfeksiyon yapıcı faktörleri uyarır ve fagozomların fagolizozomlara dönüşmesini engeller. Bununla birlikte, bu patojenlerin hücre içi yaşam şekilleri çok büyük farklılıklar gösterirken, her iki organizma da konakçı hücrede karşılaşılan stres koşullarında yaşama yeteneğine sahiptir (Gahan ve Hill 1999).

Bu patojenler, gıdaların üretimi ve depolanışı sırasında farklı çevresel stres koşullarına, tüketimin ardından ise, midenin düşük pH'sına maruz kalmaktadırlar. Mideden geçiş sırasında hayatta kalanlar ince bağırsaktaki yağ asitleri, safra ve düşük oksijene maruz kalır. Bu aşamada bağırsak florasıyla olan rekabet çok şiddetlidir, bu şartlarda da canlı kalanlar bağırsak epitel hücrelerini işgal ederek enfeksiyon oluştururlar (Hill vd. 1995, Gahan ve Hill 1999). Bakteriyel hücrelerin bağırsak reseptörlerine tutunması, çoğalması ve toksin üretimi ile sindirilen hücrelerin virülens derecesine bağlı olarak enfeksiyon semptomları oluşur (Buncic ve Avery 1998).

Asit direnci, *E. coli* O157:H7 gibi patojenlerin patojenitesi ve yaşama oranına katkıda bulunan en önemli karakteristiklerden biridir. Gıda kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde mide sıvısı önemlidir. Patojenlerin, insanlarda hastalık oluşturabilmesi için bağırsağa ulaşmadan önce midede karşılaştıkları asidik koşullara direnç göstererek yaşamını sürdürmesi gereklidir. Mide sıvısının asiditesi, gıda kaynaklı patojen saldırılarına karşı ilk engeli oluşturmaktadır (Benjamin ve Datta 1995, Merrell ve Camili 2002). *E. coli* O157:H7'yi de içeren enterik bakterilerde düşük pH'da asit tolerans yanıtı indüklenmektedir. Asit direnci, patojenin asidik gıdalarda yaşama oranını

arttırmaktadır. Midedeki asiditeye olan direnç, midedeki gastrik koşullarda yaşama kapasitesini ve bağırsak epiteline kolonize olma kapasitesini yükseltmekte ve enfeksiyon dozunun düşük olmasına neden olmaktadır (Castanie-Cornet vd. 1999, Smith 2003, Mao vd. 2006, Skandamis vd. 2007).

Gıda patojenlerine karşı savunmada midede salgılanan HCl önemli bir role sahiptir. Mide sıvısının pH'sı 1,0-2,0 arasında olup birçok patojen için öldürücüdür. *E. coli* O157:H7 hücrelerinin % 20- % 80'inin sindirilmeden canlı olarak ince bağırsağa ulaştığı *in vitro* sistemlerde belirlenmiştir (Smith 2003).

Gorden ve Small (1993)'e göre, enteropatojenik *E. coli* türleri, *E. coli* K-12 gibi patojenik olmayan türlere göre asidi daha iyi tolere edebilmektedir. *E. coli* O157:H7, pH 2,5'te 2 saat canlı kalabilmektedir.

Asit adaptasyonu, *E. coli* suşlarının organik asitlere olan direncinde artışa neden olarak, insan midesi gibi yüksek asidik koşullarda yaşama yeteneğini arttırmaktadır (Sainz vd. 2005). Farklı türlerin asit toleransı yaygın varyasyonlar göstermesine rağmen, düşük enfeksiyon dozuna sahip olan bakteriyel patojenler asidi daha iyi tolere edebilmektedir (Cheng ve Kaspar 1998). Enterohemorajik *E. coli* serotipleri asidi tolere edebilme yeteneklerine göre, yüksek asit tolerantlar (%50-100 yaşama), orta düzeyde asit tolerantlar (%10-50 yaşama) ve zayıf asit tolerantlar (< %10 yaşama) olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. Aside dirençli suşlar, pH 2,5'te en az 5 saat canlılığını sürdürmektedir (Benjamin ve Datta 1995). *E. coli* O157:H7'nin yüksek asit tolerant olduğu ve bunun patojenite açısından önem taşıdığı belirtilmiştir (Arnold ve Kaspar 1995).

Cheville vd. (1996), *E. coli* O157:H7'nin subletal düzeydeki asit stresine maruz bırakılmasıyla gıdalardaki yaşama oranının arttığı ve bu direnç artışının patojenite üzerinde önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir. *L. monocytogenes*, süt ve süt ürünleri ve özellikle de yumuşak peynirler aracılığıyla enfeksiyonlara neden olmaktadır. *L. monocytogenes*'in patojenitesinin asit toleransı ile ilgili olduğu, asit toleransının bakteriyi midenin asit engeline karşı koruduğu, epitel ve fagositik hücreler gibi farklı

hücrelerde yaşaması, yayılımı ve çoğalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Cataldo vd. 2007).

L. monocytogenes düşük sıcaklık, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi olumsuz çevresel koşullarda gelişebilme yeteneğine sahiptir. *L. monocytogenes*'in düşük pH koşullarında yaşayabilme ve tepki verme yetenekleri virülens için önemli bir rol oynamaktadır. Bu yetenekleri sayesinde makrofaj fagozomları ve insan midesi gibi olumsuz koşullara sahip ortamlarda canlılığını sürdürebilmektedir (Shabala vd. 2002, Vialette vd. 2003, Caggia vd. 2009).

L. monocytogenes'in gelişimi ve virülensi üzerinde sıcaklık, pH, tuz ve organik asitler gibi çevresel stres koşullarının etkisi araştırılmıştır. Gıdalarda tipik konsantrasyonlardaki organik asit ve NaCl varlığında *L. monocytogenes*'in logaritmik faz hücrelerinin generasyon zamanı ve maksimal hücre sayısının alternatif sigma faktör σ^B 'ye bağımlı olmadığı belirlenmiştir. *L. monocytogenes*'in Caco-2 hücrelerine saldırma yetenekleri, gelişme fazı, sıcaklık, tuz ve organik asit varlığından etkilenmektedir. NaCl, sodyum diasetat ve sodyum laktat varlığında gelişen *L. monocytogenes*'in mide sıvısında yaşama düzeyi azalmaktadır. Bu sonuçlar *L. monocytogenes*'in enfeksiyon dozunun gıdanın spesifik özelliklerinden etkilendiğini (tuz, pH ve organik asit) göstermektedir. Tuz ve organik asit gibi gıda ile ilgili stres koşullarının *L. monocytogenes*'in virülens karakteristiklerini etkilediği saptanmıştır (Garner vd. 2006).

Alternatif sigma faktör *rpoS*, *Salmonella* türlerinde iyi bilinen direnç regülatörlerinden birisi olup, stres koşullarında bakterilerin yaşama oranı üzerinde etkilidir. *Salmonella* DT104 suşunun flagellin (FliC) fajı miktarının asidik ortamlarda 82,4 kat daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Flagellaya bağımlı hücre hareketi düşük pH ile regüle edilmektedir. Fazla miktardaki flagellal proteinlerin düşük pH'lı ortamda yaşama oranını arttırdığı saptanmıştır (Berk vd. 2005).

LisRK olarak adlandırılan iki bileşenli sistem, *L. monocytogenes*'in asit direncinin regülasyonun da önemli bir role sahiptir. *L. monocytogenes*'te virülens gen ekspresyonunun regülasyonu, transkripsiyonel aktivatör olan *PrfA* tarafından

gerçekleştirilir. Genelde virölens gen ekspresyonu, artan sıcaklıkla pozitif yönde regüle olurken, mono ve disakkaritler tarafından negatif yönde regüle edilirler. *PrfA* tarafından regüle edilen enfeksiyon yapıcı faktörün (listeriolizin) düşük pH tarafından negatif yönde regüle edildiğine ilişkin bazı kanıtlar da bulunmaktadır (Gahan ve Hill 1999).

Subletal asidik (pH 5,1) koşullara maruz bırakılan *L. monocytogenes*'in, insan bağırsak epitel hücrelerine (Caco-2) yayılımının arttığı, yaşama oranının artış gösterdiği ve makrofaj benzeri hücrelerde çoğaldığı belirtilmiştir. *L. monocytogenes*'in farklı stres koşulları altında yaşamasında σ^B 'nin katkıda bulunduğu bilinmektedir. σ^B regulonu, asit koşullarda yaşamayı sağlayan; safra tuzu hidrolazları tarafından kodlanan *BSH*, internalin A tarafından kodlanan *inlA*, glutamat dekarboksilaz sistem tarafından kodlanan *gadA* gibi virölensle ilgili genleri içermektedir (Conte vd. 2000, Garner vd. 2006).

Yuk ve Marshall (2004), farklı asit çeşitlerinin kullanılmasıyla *E. coli* O157:H7'de gerçekleşen asit stresin, verotoksin üretimi, hücre zarının lipid kompozisyonu ve pH 1,5'e sahip yapay mide sıvısındaki yaşama oranı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Asit adaptasyonu ile membrandaki vaksenik asidin azaldığı ve palmitik asit miktarının arttığı tespit edilmiştir. Asidik pH'da vaksenik asit ve palmitik asit oranındaki artış, hücre zarının akıcılığının azalmasına neden olmaktadır. Asit adapte hücrelerin asit direnci artmış, verotoksin salgısı azalmıştır.

E. coli O157:H7 hücrelerinin subletal stres koşullarına maruz bırakılmasının direnç artışına ve buna bağlı olarak virölensin artmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Yuk ve Marshall (2004), *E. coli* O157:H7 tarafından üretilen Shiga toksinin pH ve organik asit çeşidine bağlı olarak üretildiğini belirtmişlerdir. Duffy vd. (2000) tarafından yürütülen çalışmada, pH 5,6'da pH 7,4'e göre daha az Shiga toksin üretildiği görülmüştür.

2.1.6 Aside tolerans kazanmanın gıda endüstrisindeki önemi

E. coli O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda, aside tolerans kazanan bakterilerin aside tolerans kazanmayan bakterilere göre asidik gıdalarda daha uzun süre canlı kaldıkları belirlenmiştir.

E. coli O157:H7'nin temel kaynağı sığırlar olmakla birlikte köpek, kuş, koyun, geyik ve insanlarda da görülmektedir. *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıklarda en önemli kaynağın yeterince pişirilmemiş sığır etleri olduğu belirtilmiştir (Berry ve Cutter 2000, Çakır 2000)

Sığırların sindirim ve boşaltım sistemlerinde asidik ortama direnç kazanan *E. coli* O157:H7'nin karkasa bulaşması halinde soğuk depo ortamında canlılığını uzun süre koruyacağı ve etten elde edilecek asitli ürünlerde de ortam sıcaklığı gibi diğer koşulların uygun hale gelmesi ile gelişmesini rahatlıkla sürdürebileceği ifade edilmiştir (Park vd. 1999).

Sığır sindirim sistemindeki organik asitler ve düşük pH'nın, *E. coli* O157:H7 ve diğer patojenlerin aside olan toleransını arttırdığı birçok araştırmada tespit edilmiştir. Berry ve Cutter (2000) tarafından yürütülen çalışmada, aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7'nin ilave edildiği sığır dışkıları, sığır karkas doku yüzeyine inoküle edilmiştir. Bu dokularda %2 asetik asit ile spreyle yıkama yapılmıştır. Asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7'nin asetik aside olan direnci artış göstermiştir.

Glukoz içeren ortamda aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 hücreleri sığır etlerini kontamine etmek amacıyla kullanılmıştır. Kontamine sığır etleri üzerine uygulanan %2'lik asetik asit solüsyonu ile yıkama sonrasında, aside adapte edilmeyen hücre popülasyonu adapte edilen hücre popülasyonuna kıyasla daha hızlı azalmıştır (Samelis vd. 2005).

Durma fazındaki *E. coli* O157:H7'nin asit toleransının belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, %1 glukoz içeren TSB besiyerinde hücreler aside adapte edilmiştir. Aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 hücreleri sığır etine inoküle edilmiştir. İnoküle sığır eti sıcak suya (75 °C'da 30 saniye) daldırılmış ve daha sonra % 2'lik laktik asit (55 °C) ile muamele edilmiştir. İnoküle sığır etleri 4-15 °C'da 6 gün depolanmıştır. Sığır etlerine inoküle edilen asit adapte *E. coli* O157:H7 laktik asit uygulamasına karşı adapte edilmeyen hücrelere kıyasla daha dirençli hale gelmiştir (Stopforth vd. 2007).

Asit adapte hücrelerin, organik asitlere olan direncinin arttığı ve asit adapte hücrelerin adapte olmayan hücrelere göre düşük pH'lı gıdalarda daha iyi yaşama oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Buna ilaveten araştırmaların bazılarında asit adapte *E. coli* hücrelerinin buzdolabı sıcaklığındaki mayonez, ketçap, hardal ve pastörize edilmemiş elma suyunda, oda sıcaklığındakine oranla daha uzun süre canlı kaldığı görülmüştür. Pastörize edilmeyen elma suyunda (pH 3,6-4,0) *E. coli* 8 °C'da 31 gün canlılığını sürdürmektedir (Rhee 2003).

Erdoğrul ve Erbilir (2005) tarafından yürütülen çalışmada, *E. coli*'nin asit ve alkali pH'lara olan direnci araştırılmıştır. Dört saat süreyle pH'sı 5,0 olan TSB besiyerinde aside adapte edilen *E. coli*, mango suyu (pH 3,0), limon suyu (pH 3,5), düşük yağlı yoğurt (pH 4,0) ve yağlı yoğurda (pH 4,0) inoküle edilerek 4 °C ve 25 °C'da depolanmıştır. Asit adaptasyonu ve soğukta depolama ile *E. coli*'nin yaşama oranı artmıştır.

Monosodyum glutamat (MSG), gıda endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan lezzet arttırıcıdır. *E. coli* O157:H7'de tespit edilen asit direnç sistemlerinden biri olan glutamat bağımlı sistemin, glutamat içeren minimal ortamlarda koruma sağladığı, gıdalara ilave edilen glutamatın bu direnç sistemini aktive ederek gıda güvenliğini tehdit edeceği belirtilmiştir. Campbell vd. (2004) tarafından *E. coli* O157:H7'nin asit toleransı ve soğuk depolamada yaşama oranı üzerinde tuz, MSG ve pH'nın kombine etkisinin araştırıldığı çalışmada, MSG kullanımıyla *E. coli* O157:H7'nin asit direncinin artış gösterdiği saptanmıştır.

Çoğu gıdanın asidik pH'sı, gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini önleyen en önemli faktörlerden birisidir. Gahan vd. (1996), aside adapte olmuş ve olmamış *L. monocytogenes*'in farklı asidik gıdalarda yaşama oranlarını karşılaştırmışlardır. Üç molar laktik asit ile pH'sı 3,5'e ayarlanmış ortama uzun süre maruz bırakılarak aside dayanıklı mutantlar elde edilmiştir. Aside adapte olmuş *L. monocytogenes* ve aside dayanıklı mutant suşu ticari yoğurt ve laboratuvar koşullarında üretilen ev tipi peynirde daha yüksek yaşama oranı göstermiştir. Aside dayanıklı mutant, çedar peyniri gibi sert peynirlerin olgunlaşması sırasında daha yüksek direnç göstermiş ve 70 günlük olgunlaşma döneminden sonra çok fazla sayıda hücre geri alınmıştır. Ayrıca aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in aside adapte edilmeyen kültüre kıyasla daha yüksek yaşama oranına sahip olduğu görülmüştür. Aside dayanıklı mutant suşta fermentasyonun ilk 4 saatinde, aside adapte olmuş hücrelere benzer bir hayatta kalış sergilemiştir.

Cheng ve Chou (2001) tarafından yürütülen çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin iki suşu pH'sı 5,0'a sahip TSB besiyerinde 4 saat aside adapte edilmiştir. Aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 hücreleri mango suyu (pH 3,2), kuşkonmaz suyu (pH 3,6) ve düşük yağlı yoğurda (pH 3,9) inoküle edilerek 7 °C ve 25 °C'da depolanmış ve yaşama düzeyleri tespit edilmiştir. Asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7'nin asidik meyve sularındaki yaşama düzeyi artmıştır.

Ryu ve Beuchat (1998) tarafından yürütülen çalışmada, asit adaptasyonunun *E. coli* O157:H7'nin elma ve portakal suyunda yaşama düzeyini arttırmadığı, fakat bakteri sayısının 5 °C'da depolanan örneklerde, 25 °C'da depolanan örneklerle kıyasla daha yüksek oranda canlı kaldığı, canlılığın 42 gün boyunca sürdüğü belirlenmiştir. Stopforth vd. (2004) tarafından da asit adaptasyonunun, *E. coli* O157:H7'nin elma dokularında canlı kalması üzerinde önemli bir artış sağlamadığı rapor edilmiştir. .

Leyer vd. (1995), pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin, fermente bir et ürünü ve dilimlenmiş kuru salamda, canlı kalma düzeyi araştırılmıştır. Fermente et ürünü, fermentasyon sonunda (pH 4,4) kontrol kültürü $2,2 \times 10^4$ kob/g düzeyinden $1,2 \times 10^2$ kob/g düzeyine, aside tolerans kazandırılan kültür $2,3 \times 10^4$ kob/g

düzeinden $5,0 \times 10^3$ kob/g düzeine düşmüştür. Beş °C'da depolanmış dilimlenmiş salamda ise (pH 5,0) 100 saat sonra aside tolerans kazandırılan költür $1,2 \times 10^3$ kob/g, kontrol költürü ise $1,6 \times 10^2$ kob/g düzeinde canlı kalmıştır. Aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 inoküle edilen elma şaraplarının 4 °C'da depolanmasından 28 saat sonra, aside tolerans kazanmamış *E. coli* O157:H7 canlılığını tamamen yitirmiş, aside tolerans kazanmış *E. coli* O157:H7 sayısı ise yalnızca 10 kat azalmıştır.

Riordan vd. (2000), aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7'nin, fermente bir et ürünü olan pepperoni'deki yaşama düzeini araştırmışlardır. Fermantasyon süresince, aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 sayısı 0,95 log kob/g, aside adapte edilmeyen *E. coli* O157:H7 sayısı ise 0,42 log kob/g azalmıştır. Asit adaptasyonu, fermantasyon aşamasında *E. coli* O157:H7'nin canlı kalma düzeini arttırmıştır.

Coşansu ve Ayhan (2000) tarafından yürütölen bir çalışmada, 3 gün 24 ± 2 °C ve %90-95 nispi nem koşullarında ve 5 gün 22 ± 2 °C'da sıcaklıkta %80- 85 nispi nem koşullarında fermantasyona tabi tutulan sucuklara inoküle edilen *E. coli* O157:H7'nin yaşama düzei incelenmiştir. *E. coli* O157:H7 sayısının, fermantasyon ve kurutma periyodu boyunca 3 logaritmik birim azalma gösterdiği, bu organizmanın vakum uygulanarak ambalajlanmış örneklere vakum uygulanmamış örneklere nazaran daha uzun süre canlılığını sürdürdüğu belirlenmiştir. Calicioglu vd. (2001) tarafından yürütölen çalışmada ise, starter költür kullanılarak hazırlanan sucuklarda, 24 °C'da 3 günlük fermantasyon (pH 4,6) ve kurutma (%40 nem) aşamasından sonra *E. coli* O157:H7 sayısının 2,0 log kob/g azaldığı saptanmıştır.

Öz vd. (2002) tarafından, sucuk üretiminde farklı nitrit dozlarının ve starter költür kullanımının, *E. coli* O157:H7'nin gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Sucuk hamuruna ilave edilen *E. coli* O157:H7 olgunlaştırma-depolama süresince azalma eğilimi göstermiş olup, 3. günde 0,50; 7. günde 1,00; 14. günde 2,50; 21. günde 4,00 logaritmik birim azalmıştır. Starter költür kullanımına bağlı olarak, pH değerı olgunlaştırmanın ilk günlerinde hızlı bir düşüş göstermiştir.

Glass vd. (1992), fermente bir et ürününde *E. coli* O157:H7'nin davranışı üzerine pH ve NaCl'nin etkileri araştırılmıştır. Fermente ürün hamuruna $4,8 \times 10^4$ kob/g düzeyinde *E. coli* O157:H7 inoküle edilerek, pH 4,8'e düşünceye kadar fermentasyona bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra vakum paketlenme yapılarak 4 °C'da iki ay depolanmıştır. Bakterinin fermentasyon, kurutma ve depolama süresince gelişemediği, canlılığını sürdürdüğü ve depolama sonunda yalnızca 2 logaritmik birim azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Fermente sucuklarda, *Lactobacillus* spp. tarafından üretilen organik asitlere bağlı olarak meydana gelen pH düşüşü, düşük su aktivitesi, nitrit ve tuz konsantrasyonu patojen bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (Erol vd. 1999, Lindqvist ve Lindblad 2009). Buna karşın, Colak vd. (2007) tarafından yürütülen çalışmada, marketlerden temin edilen 300 sucuk örneğinin 63'ünde (%21) *Listeria* spp. ve 35'inde (%11,6) *L. monocytogenes* izole edilmiştir.

Kaya ve Gökalp (2004) tarafından, starter kültür kullanımının *L. monocytogenes*'in gelişimini engellediği gösterilmiştir. Starter kültür kullanılmadan üretilen sucuklarda *L. monocytogenes* sayısı, olgunlaştırmanın 3. gününde 10^3 log kob/g artmıştır. Starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda ise, ilk üç gün içinde, *Lactobacillus* spp. sayısı 10^9 log kob/g düzeyine ulaşmış, pH değeri 5,0'ın altına düşmüş ve *L. monocytogenes* gelişmemiştir. Ayrıca starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda, olgunlaştırmanın başlangıcında %59,38-%60,11 arasında olan nem değeri, 12. günde %36,72-37,34 olarak bulunmuştur.

Erkmen (2008) tarafından yürütülen çalışmada, fermente sucuğa ilave edilen *L. monocytogenes*'in, olgunlaştırma periyodu süresince sayısının azaldığı, 25. günden sonra ise bakterinin tespit edilemediği belirtilmiştir.

Laktik asit bakterileri, sucuk hamuruna katılan şekerlerden laktik asit üretmektedir. Laktik asit, üründe pH değerini düşürürken, ekşi tat oluşumuna neden olur. pH düşüşünün etkisiyle, et proteinlerinin denatürasyonu sonucu meydana gelen yapısal değişimler son ürün tekstürünün oluşumuna katkıda bulunur. Laktik asit bakterilerinin inhibitör etkisi, organik asit ve antibakteriyel maddeler üretme yetenekleri ile ilgilidir. Bu antibakteriyel maddeler H_2O_2 , reuterin ve bakteriyosinlerdir (Yaman vd. 1998, Çon

ve Gökalp 2000, Kayardı ve Gök 2003). *Lactobacillus* spp. dışında fermente et ürünlerinde en fazla kullanılan türler, Micrococcaceae familyasında yer alan *Staphylococcus carnosus* ve *S. xylosus*'tur. Bu ikincil kültürler ürünün lezzet ve renk özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Ensoy 2004).

Fermente yarı kuru sucukların, fermentasyonu ve kurutulması aşamasında, pH 5,3 ve 4,8 olduğunda, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 sayısının sırasıyla 0,07-0,74 log kob/g; 0,03-1,11 log kob/g düzeyinde azaldığı bildirilmiştir (Porto-Fett vd. 2008).

Erol vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente sucuklara inoküle edilen *L. monocytogenes* sayısının, olgunlaştırma periyodunun sonunda (14 gün), bakteriyosin oluşturan kültür ilave edilen sucuklarda, 0,03 EMS/g seviyesine, bakteriyosin oluşturmayan kültür içeren sucuklarda 2,4 EMS/g düzeyine düştüğü saptanmıştır.

Fermentasyon işlemi süresince laktik asit bakterisi sayısındaki artışa bağlı olarak sucukların pH değerinde düşüş gözlenmektedir. pH değerinin fermentasyon sonrası 5,3 ve altında bir değere ulaşması arzu edilmeyen mikrofloraya karşı nitritin daha etkin olmasını sağlamakta, mikrobiyel kalite açısından daha güvenilir bir ürün elde edilmektedir. Hampikyan ve Uğur (2007) tarafından, fermente sucuklarda başlangıç pH değerinin 5,87-5,90 olduğu ve olgunlaştırmanın 30. gününde pH'nın 4,72-4,82'ye ulaştığı ifade edilmiştir. Yıldız-Turp ve Serdaroğlu (2008)'na göre, başlangıç pH'sı 5,49-5,59 olan fermente sucukların pH değeri, olgunlaştırmanın 12. gününde 4,60-4,82'ye ulaşmıştır.

Erkmen (2009) tarafından yapılan bir araştırmada, starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda, fermentasyon süresince pH'nın hızla düştüğü ve 3. günde en düşük seviyeye ulaştığı belirtilmiştir (pH 4,82-4,92). Bozkurt (2007), olgunlaştırmanın ilk 3 gününde pH'nın düştüğü (5,84'ten 4,40'a) daha sonra pH'da artış (5,40'tan 5,50'ye) meydana geldiğini ifade etmiştir. pH değerinde gözlenen bu artışın aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucunda protein olmayan azotlu bileşik konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığı belirtilmektedir.

Sucuk üretiminde, *Lactobacillus* spp. tarafından karbohidratlar fermente edilerek laktik asit oluşmakta ve pH düşmektedir. Daha düşük ortam pH'sı, bakteriyel hücrelerin homeostasis sistemini etkileyerek gelişimi inhibe etmektedir. Buna ilaveten pH'nın azalmasına bağlı olarak etin su tutma kapasitesi azalmakta ve kuruma hızlanmaktadır (Gonzalez-Fandos vd. 1999, Soyer vd. 2005).

Dalmış ve Soyer (2008), starter kültürlü sucuklarda, başlangıç nem oranının %60,12 olduğunu ve olgunlaştırmanın 9. gününde %39,5'e düştüğünü belirtmişlerdir. Bu dönemde pH değeri, 5,73'ten 4,62'ye azalmıştır. Starter ilave edilen sucuklarda pH, nem ve su aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu da saptanmıştır.

Fermente sucuklarda *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un yaşama düzeyi üzerinde, pH, su aktivitesi ve depolama sıcaklığının önemli bir faktör olduğu saptanmıştır (Hwang vd. 2009). Fermente sucukların pH'sı 5,2-4,6 iken, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* sayısı sırasıyla, 0-0,9; 0,1-0,5 ve 0-2,2 log kob/g azalmıştır. Bakteri sayılarındaki azalma, 30 °C'da depolanan sucuklarda, 4 ve 21 °C'da depolanan sucuklara kıyasla daha yüksektir.

Lindqvist ve Lindblad (2009) tarafından yapılan bir araştırmada, fermente sucuklara ilave edilen, aside adapte edilmiş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica*'nın canlılık düzeyi üzerinde depolama sıcaklığının ve süresinin etkisi araştırılmıştır. 8 °C'da depolanan sucuklarda bakteri sayısının 1,0 log birimi azalması için gerekli süre, *E. coli* O157:H7'de 21 gün, *L. monocytogenes*'te >16 gün ve *Y. enterocolitica*'da 18 gün olarak belirlenmiştir. Yirmi °C ve daha yüksek sıcaklıklarda depolamada ise, *E. coli* O157:H7 için 7-11 gün, *L. monocytogenes* için 4-7 gün ve *Y. enterocolitica* için 1-4 gün gerektiği saptanmıştır.

Dourou vd. (2009) tarafından yürütülen çalışmada, Alman kökenli sürülebilir sucukların (Teewurst) 1,5, 4 ve 10 °C'da 30 günlük depolanmasından sonra, *E. coli* O157:H7 sayısı 2,3; 3,2 ve 3,0 log kob/g, *L. monocytogenes* sayısı 2,2; 2,6 ve 2,6 log kob/g azaldığı belirlenmiştir. Uyttendaele vd. (2001) tarafından, 7 °C'da depolanan fermente

sucuklarda (pH 4,5, %5 NaCl) *E. coli* O157:H7'nin, 35 gün boyunca canlılığını sürdürdüğü rapor edilmiştir.

2.1.7 Tuza tolerans kazanma

Gıdaların korunması amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır, bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanlarından birisi ozmotik basıncın artırılması ya da su aktivitesinin azaltılmasıdır (Gutierrez vd. 1995, Adhikari 2005).

Mikroorganizmalar, sürekli olarak değişen ortamları algılayıp, onlara adapte olabilirler ve bu onların gelişimi ve hayatta kalmaları açısından çok önemlidir. Mikroorganizmaların ozmotik strese yanıtı, hem fizyolojik değişimleri hem de gen ekspresyonundaki değişiklikleri içerir ve bu duruma ozmoadaptasyon denilmektedir. Su aktivitesini düşürmek için tuzun kullanılması, gıdaları korumak için gıda endüstrisi tarafından kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bununla beraber *L. monocytogenes* gibi patojenlerin yüksek tuz konsantrasyonlarına uyum sağlayarak hayatta kalması, gıdalardaki patojenlerin kontrol edilmesini zorlaştırmaktadır (Gandhi ve Chikindas 2007).

Mikroorganizmalar gıdalardaki yüksek tuz ve şeker konsantrasyonu nedeniyle de ozmotik strese maruz kalırlar. Bu koşullar altında hücrelerin turgor basıncını koruyabilmeleri hayati öneme sahiptir. *E. coli*'de turgor basıncın regülasyonundan birkaç sistem sorumludur. Bu sistemlerin asıl fonksiyonu, hücre içi ozmotik basıncı düzenleyen maddelerin birikimini sağlamak, yüksek ozmotik basınçta bakteriyel gelişimi sağlayan enzimlerin aktivitesinin inhibe edilmesini önlemektir. *E. coli* hücrelerinde ozmotik şok yanıtının başlangıç aşamasında, K⁺ ve glutamat miktarı önemli düzeyde artarak turgor basıncı yeniden düzenlenir. Ozmotik stres nedeniyle hücre metabolizmasında da değişiklikler olur. Yüksek tuz konsantrasyonuna maruz kalan hücrelerin yağ asidi bileşimi değişir (Russell vd. 1995, Azizoğlu 2005).

Ozmotik koşullara adaptasyonda, en maddelerin rolü konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Kk organik moleküller olan bu maddeler, yüksek konsantrasyonlara kadar nebilirler ve ozmotik strese girmiş hücre sitoplazmalarında yüksek değerlerde birikebilirler. Bunlar, ntrl moleküllerdir. Dış ozmotik basıncın belirlediği düzeyde, hücre zarı, bu moleküllere kontrollü geçirgenlik gösterir. Enzimlere zarar vermez, hatta tuzun neden olduğu denatürasyondan koruyabilir. Değişik mikroorganizmalar tarafından biriktirilen bu maddelere örnek olarak; betain, trehaloz, gliserol, sukroz, prolin, mannitol, glusitol, ektoin ve küçük peptitler verilebilir. Glisin betain, prolin betain, asetil karnitin, karnitin, -butirotain ve 3-dimetil sulfoniopropionatın *L. monocytogenes*'te ozmotik koşullarda koruyucu olarak görev yaptıkları belirlenmiştir. Bu bileşiklerin varlığı, tuz stresi altındaki hücrelerin üreme oranlarında, herhangi bir koruyucu bulunmayan ortamda stres altında bulunan hücrelere kıyasla 2,6 kata kadar artışla sonuçlanmıştır. Hücreler, ozmotik strese yanıt olarak dış ortamdan ozmotik basıncı düzenleyen maddeler alırlar ve bu da hücre içinde ozmotik dengenin yeniden kurulmasına yardımcı olur (Gutierrez vd. 1995, Park vd. 1995, Duche vd. 2002, Gandhi ve Chikindas 2007).

L. monocytogenes'in ozmotik strese adaptasyonu, betain ve aminoasit biriktirme yeteneğine bağlıdır. Betain, şeker pancarında ve diğer bitki kökenli gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. *L. monocytogenes*'in betain alımı; enerji bağımlı, tuz ya da soğuk stres uyarımlı taşıma sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Hücreler yüksek tuz konsantrasyonunda (%4 NaCl), tuzsuz ortamdan 200 kat; 7°C'da, 30°C'dan 15 kat daha hızlı betain biriktirmektedir. Bakterinin tuza olan direnci, düşük sıcaklıkta daha yüksektir. Glisin betain *E. coli*'nin yüksek tuz konsantrasyonuna olan direncinde artışa neden olmaktadır (Gutierrez vd. 1995, Park vd. 1995).

Ozmotik stres koşullarında, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* sitoplazmada betain biriktirme yeteneğine sahiptir (Abee ve Wouters 1999).

Karnitinin, *L. monocytogenes*'in yüksek tuz konsantrasyonunda gelişimine katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Karnitin konsantrasyonu, hayvansal gıdalarda, bitkisel gıdalara

oranla daha yüksektir. *L. monocytogenes*'te, ATP bağımlı L-karnitin taşıma sistemi, karnitinin gıdalarda iz miktarda bulunduğu durumlarda bile, bakterinin L-karnitini kullanmasına olanak sağlar. Düşük tuz konsantrasyonunda da karnitin birikimi gerçekleşmektedir. *L. monocytogenes*'te betainin, hem ozmotik hem de soğuk strese karşı koruyucu etkisi olduğu ispatlanmıştır. Hücreler, 7 °C gibi düşük sıcaklıkta da, yüksek konsantrasyonda L-karnitin biriktirebilmektedir (Ko vd. 1994, Verheul vd. 1995).

L. monocytogenes'in ozmotik strese adaptasyon mekanizmaları farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Patchett vd. (1992) tarafından yürütülen çalışmada, 75 g/L NaCl varlığında geliştirilen hücrelerin K⁺, betain, glisin, alanin ve prolin konsantrasyonunun, NaCl yokluğunda geliştirilen hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ko vd. (1994), *L. monocytogenes*'in ozmotik stres altında gelişimi sırasında hücre içindeki glisin betainin artması sonucu tuza olan toleransının arttığı belirtilmiştir.

Tuz stresini tolere etmek için *L. monocytogenes* tarafından kullanılan mekanizmalardan bir diğeri, bazı proteinlerin sentezinin artmasına veya azalmasına neden olan genlerin ekspresyonunun değişimidir. *L. monocytogenes*'te tuz stresinde 12 proteinin sentezi uyarılmıştır. Bu proteinlerin soğuk şok sırasında uyarılan iki grup proteinle (Csp ve Cap) benzer oldukları anlaşılmıştır. Ozmotik stres sırasında, hızlı bir şekilde uyarılan fakat kısa bir süre için var olan tuz şoku proteinleri (Ssp) ile hızlı bir şekilde uyarılan ve koşullar normale döndükten sonra birkaç saat daha ortamda varlığını devam ettiren stres ortamına alışma proteinleri (Sap) saptanmıştır. *L. monocytogenes*'te uyarılmış Ssp'ler arasında, iki genel stres proteini (*DnaK* ve *Ctc*) tanımlanmıştır. *DnaK*, sıcak şok proteini olarak görev yapmakta ve hücre proteinleri stabilize etmektedir. Tanımlanan Saps'ler arasında olan *GbuA*, tuz stres yanıtı sırasında uyarılmakta olup glisin betain için ozmoprotektan olarak görev yapar. *Ctc* proteini de tuz stres yanıtında uyarılmaktadır. *Ctc* geni, ortamda glisin betain ve karnitin gibi ozmotik koruyucuların yokluğunda *L. monocytogenes*'in yüksek ozmotik basınca direncine katkıda bulunmaktadır (Gandhi ve Chikindas 2007).

Tuz stresinde yüksek oranda uyarılan proteinlerin, genel stres proteinleri (*Ctc* ve *DnaK*), taşıyıcılar (*GbuA* ve mannoz spesifik fosfotransferaz sistem enzimi HAB) ve

genel metabolizma proteinleri (alanin dehidrogenaz, *CcpA*, *CysK*, *EF-Tu*, *Gap*, *GuaB*, *PdhA* ve *PdhD*) olduğu bildirilmiştir (Duche vd. 2002, Kazmierczak vd. 2003).

Esvan vd. (2000) tarafından yürütülen çalışmada, izotonik koşullarda (5 g/L NaCl) geliştirilen *L. monocytogenes*'te çok sayıda protein sentezlendiği belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonu 35 g/L iken, bu proteinlerden beşi baskılanırken, 65 g/L NaCl konsantrasyonunda yirmibiri baskılanmış ve onbiri tamamen kaybolmuştur.

L. monocytogenes'te tespit edilen genel stres sigma faktörü σ^B , ozmotik koruyucu olarak betain ve karnitin kullanımında önemlidir. Ozmotik stres yanıtına katkıda bulunan etc geni ekspresyonunun σ^B faktörüne bağımlı olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'de ozmotik stres koşullarında *treA* geni uyarılmaktadır (Gutierrez vd. 1995, Gandhi ve Chikindas 2007).

Ozmotik stres yanıtına katılan iki komponentli transdüksiyon sistemlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu sistemlerden biri olan Kdp alım sistemi, potasyumun (K^+) *L. monocytogenes* hücresinin içine alınması işlemine katılmaktadır. Yapılan araştırmalar yüksek ozmotik strese adaptasyonda hem *kdpE* ve hem de *orfX* genlerinin ekspresyonunun gerektiğini ve bu etkinin ortamdaki potasyum düzeyine bağlı olduğuna işaret etmektedir. Böylece, Kdp sistemi vasıtasıyla ortamdan potasyum alımı, tuz stresine karşı *L. monocytogenes* üzerinde koruyucu etkiye sahip olmaktadır. *orfX* geni, σ^B 'nin aktivasyonunu başlatmaktan sorumludur (Gandhi ve Chikindas 2007).

Farber vd. (1992), *L. monocytogenes*'in 130- 140 g/L NaCl varlığında 15- 30 °C'da gelişme yeteneklerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda optimum gelişme 15 °C'da 80 g/L NaCl varlığında gerçekleşmiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen *L. monocytogenes* suşları, %3,5 NaCl içeren besiyerinde 2 saat inkübe edilerek tuza tolerans kazandırılmış ve %20 NaCl içeren ortamdaki yaşama düzeyleri belirlenmiştir. Tuz toleransı, suşlar arasında farklılık göstermiş olup, 9 suştan ikisinin tuz direncinde artış sağlanamamıştır (Faleiro vd. 2003).

Vasseur vd. (1999) tarafından yürütülen çalışmada, *L. monocytogenes*'in pH 5,0-8,0'da, 25 °C'da ve %10 NaCl içeren Nutrient Broth'ta gelişebildiği, farklı miktarlarda ilave edilen NaCl'nin ozmotik basıncı arttırması ile lag fazın uzadığı ve gelişme oranının azaldığı tespit edilmiştir. Ozmotik stresin bakteriyel popülasyon üzerindeki etkisinin ortamdaki su aktivitesine ve sıcaklığa bağlı olduğu ifade edilmiştir.

Casey ve Condon (2002) tarafından, fermente et modelinde pH 4,2'nin *E. coli* O157:H7'ye bakterisidal etkisi üzerine NaCl'in (%4) etkisi araştırılmıştır. Hücrelerin NaCl ve asit varlığında, yalnızca asit olan ortama göre daha iyi yaşama oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu kombine etki, ortamın su aktivitesinin azalmasından kaynaklanmıştır.

E. coli O157:H7'nin canlı kalma oranı üzerinde, asit ve NaCl'nin etkisi araştırılmıştır (Glass vd. 1992). *E. coli* O157:H7'nin %6,5 gibi yüksek NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği görülmüştür. Fakat %6,5 NaCl varlığında lag fazın normalden daha uzun olduğu, bunun tuz tolerant popülasyonunun seçimi için önemli olabileceği belirtilmiştir.

Faleiro vd. (2003), peynirlerden izole edilen *L. monocytogenes*'in, pH (5,1-6,2) ve NaCl (%2-3,5) stresine olan yanıtını araştırmışlardır. NaCl'de (%3,5) inkübasyon sonrasında ozmotik koşullara olan tolerans artmıştır. Ozmotik tolerans yanıtı asit şok (pH 3,5) koşullarına, asit tolerans yanıtı da ozmotik şok koşullarına karşı çapraz direnç sağlamıştır. *L. monocytogenes*, %25,5 NaCl içeren TSB besiyerinde 37 °C'da 4 gün, 22 °C'da 24 gün ve 4 °C'da 132 günden daha uzun süre canlılığını sürdürmüştür.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Denemelerde kullanılan *E. coli* O157:H7 1461 suşu İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kültür Koleksiyonu (KÜEN) ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Sucuk üretiminde kullanılan hammadde ve starter kültür

Sucuk üretiminde kullanılan sığır eti ve kuyruk yağı Gürsoylar kasabından, sucuk hamuruna katılan baharat ise ısıtılmış olarak Bağdat Baharat A. Ş.'den temin edilmiştir. Üretimde; *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* ve *Lactobacillus curvatus* suşlarını içeren liyofilize formda Sacco LYOCARNI RBL-73 marka ticari starter kültür preparatı kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

E. coli O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in sıvı formdaki stok kültürleri, gliserol içeren (% 20; v/v) Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde -20±2 °C'da muhafaza edilmiştir. Denemeler için 10 mL TSB besiyerine stok kültürlerden 100 µL aktarılıp, 37 °C'da 24 saat inkübe edilerek bakteriler aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme işlemi iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.2 Bakterilerin gelişme eğrisinin oluşturularak durma fazının saptanması

Aktif bakteri kültürlerinden 5 µL alınarak 50 mL TSB besiyerine aktarılmış ve 37 °C'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. saatinden itibaren kültürlerden 18 saat boyunca her saat başında tek kullanımlık küvetlere aktararak, UV/VIS (Shimadzu UV-1208) spektrofotometresinde 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. İncelencek örneğin absorbans değeri okunmadan önce bakteri aşılınmamış TSB besiyeri kullanılarak spektrofotometre ayarlanmıştır (O'driscoll vd. 1996). Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, durma fazı için gerekli inkübasyon süreleri belirlenmiştir.

3.2.3 Bakterilere aside tolerans kazandırma

E. coli O157:H7'nin 14 saatlik, *L. monocytogenes*'in 15 saatlik durma fazı hücreleri denemelerde kullanılmıştır. 50 mL TSB besiyerine aktif *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* kültürlerinden 5 µL aktarılıp, 37 °C'da 14-15 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda kültürler 9'ar mL olacak şekilde santrifüj tüplerine aktarılmış ve 10 dakika boyunca 5000 rpm hızda (Hettich EBA 12; Almanya) santrifüjlenmiştir. Fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak süspanse edilen hücre peletleri iki kez daha santrifüjleme işlemiyle yıkanmıştır. Bu şekilde elde edilen hücre peletleri, 6 N HCl (%37; Merck), 5 M asetik asit (%100; Merck), 3 M laktik asit (%85 DL-laktik asit; Sigma) ve 1 M sitrik asit (%99,5; Merck) çözeltisi kullanılarak, pH'sı 4,5; 5,0 ve 5,5'e ayarlanmış 10 mL TSB besiyerinde 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Aside tolerans kazandırılmış (ATK⁺) kültürler, bu yolla elde edilmiştir. Aside tolerans kazandırılmamış (ATK⁻) kültürün hazırlanmasında ise, aktif bakteri kültürlerinden 50 mL TSB besiyerine 5 µL aktarılmış ve 37 °C'da 14-15 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürler santrifüj edilmiş ve elde edilen hücre peleti pH'sı 7,0 olan 10 mL TSB besiyerinde süspanse edilmiştir (Çizelge 3.1) (Cheng vd. 2003).

3.2.4 Aside tolerans kazandırılan kültürlerin aside dirençlerinin belirlenmesi

HCl kullanılarak pH'sı 2,5; 3,0 ve 3,5'e, asetik, laktik ve sitrik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış 50 mL TSB besiyerine, ATK^- ve ATK^+ kültürlerden 0,5 mL inoküle edilmiş ve 37 °C'da inkübasyona bırakılmıştır (Cheng vd. 2003). Ön denemeler sonucunda, HCl kullanılarak gerçekleştirilen adaptasyonda *E. coli* O157:H7'nin 48 saatten, *L. monocytogenes*'in ise 24 saatten daha kısa süre canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle; HCl kullanılarak yapılan denemelerde *E. coli* O157:H7'de inkübasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 ve 48. saatlerinde, *L. monocytogenes*'te inkübasyonun 0, 1, 2, 3, 4, 5. saatlerinde, organik asit kullanılarak yapılan denemelerde ise inkübasyonun 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikasinda Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) besiyerine yayma kültür yöntemiyle ekim yapılarak 37 °C'da inkübasyona bırakılmış ve bakteri sayısı kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1) (Temiz 2000).

3.2.5 Bakterilerin laktik aside olan çapraz dirençlerinin belirlenmesi

Farklı asitlere karşı tolerans kazandırılan kültürlerin, sucuğun fermentasyonu sırasında oluşan laktik aside olan dirençleri tespit edilmiştir. Bu amaçla, ATK^+ ve ATK^- bakteri kültürlerinden 0,5 mL alınıp, laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış 50 mL TSB besiyerine aktarılmış ve 37 °C'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikasinda TSA besiyerine ekim yapılarak bakteri sayısı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1 Bakterilere aside tolerans kazandırma ve aside dirençlerinin belirlenmesi

ATR ⁻ (TSB'de 14-15 saat)		ATR ⁺ (TSB'de 14-15 saat).											
		pH 4,5				pH 5,0				pH 5,5			
Yaşama Düzeyi	↓ ↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	↓	pH	↓	↓	↓	pH	↓	↓	↓	pH	↓	↓	↓
	↓	2,5	pH	↓	↓	2,5	pH	↓	↓	2,5	pH	↓	↓
	↓	3,0	2,5	pH	↓	3,0	2,5	pH	↓	3,0	2,5	pH	↓
	pH	3,5	3,0	2,5	pH	3,5	3,0	2,5	pH	3,5	3,0	2,5	pH
	2,5		3,5	3,0	2,5		3,5	3,0	2,5		3,5	3,0	2,5
	3,0			3,5	3,0			3,5	3,0			3,5	3,0
	3,5				3,5				3,5				3,5

3.2.6 Bakterilerin tuza tolerans kazandırılması ve tuz dirençlerinin belirlenmesi

Aktif *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* kültürlerinden 5 µL alınarak 50 mL TSB besiyerine aktarılmış ve 37 °C'da 14-15 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda kültürler 9'ar mL olacak şekilde santrifüj tüplerine aktararak 10 dakika boyunca 5000 rpm hızda (Hettich EBA 12) santrifüjlenmiştir. FTS kullanılarak süspanse edilen hücre peletleri iki kez daha santrifüjleme işlemiyle yıkanmıştır. Bu şekilde elde edilen hücre peletleri %3,5 NaCl içeren TSB besiyerinde 37 °C'da 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültür tekrar santrifüj edilip elde edilen hücre peleti 10 mL phosphate-buffer (PBS) solüsyonuna aktarılmıştır. Bu solüsyondan 1 mL alınıp, 10 mL % 8 NaCl içeren PBS solüsyonuna aktararak 4 °C ve 25 °C'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 25. günlerinde TSA besiyerine yayma kültür yöntemiyle ekimler yapılarak 37 °C'da inkübasyona bırakılmış ve bakteri sayısı kob/mL olarak tespit edilmiştir (Lou ve Yousef 1997).

3.2.7 Sucuk üretimi

Son üründe %25 yağ içerecek şekilde hazırlanan sığır eti ve kuyruk yağı, kuşbaşı doğrandıktan sonra, 3 mm çaplı diskten geçirilerek kıyma haline getirilmiştir. Kıymalar, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi ışınlama tesisinde 25 kGy dozda ışınlanmış ve kullanılıncaya kadar -20 ± 2 °C'da muhafaza edilmiştir. Sucuk üretiminden bir gece önce çözdürülen kıymalara, %1,6 NaCl, %1,2 sarımsak, %0,5 sakkaroz, %0,5 acı kırmızıbiber, %0,6 tatlı kırmızıbiber, %0,6 karabiber, %0,8 kimyon, %0,04 NaNO₃ ve %0,01 NaNO₂ ilave edilmiştir (Soyer vd. 2005). Ticari starter kültür de ilave edilen sucuk hamuru, mikser yardımıyla karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Bu aşamadan sonra, araştırmada 3 deneme grubu oluşturulmuştur. Birinci deneme grubunun sucuk hamuruna, aside tolerans kazandırılmış *E. coli* O157:H7 (10^5 kob/g) ve *L. monocytogenes* (10^5 kob/g), ikinci deneme grubunun sucuk hamuruna, tuza tolerans kazandırılmış *E. coli* O157:H7 (10^5 kob/g) ve üçüncü deneme grubunun (kontrol) sucuk hamuruna aside adapte edilmemiş *E. coli* O157:H7 (10^5 kob/g) ve *L. monocytogenes* (10^5 kob/g) ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan sucuk hamurları buzdolabında (4 °C'da) 1 gece bekletilerek katkıların ete daha iyi nüfuz etmesi sağlanmıştır. Sucuk hamurları, el tipi kıyma makinesi ile, 50-60 g olacak şekilde suni kılıflara doldurulmuş ve olgunlaştırma işlemine başlanmıştır.

Sucuklar, sıcaklık ve nem düzeyi otomatik olarak ayarlanabilen klima odasında birbirini takip edecek şekilde 3 gün 22 °C'da %85-90; 3 gün 22 °C'da %80-85 ve 2 gün 20 °C'da %65-70 nispi nem koşullarında olgunlaştırılmıştır (Soyer vd. 2005). Olgunlaştırma aşamasından sonra sucuklar 4 °C'da depolanmıştır.

3.2.8 Sucuklarda mikrobiyolojik analizler

Sucuklardan 10 g örnek alınarak, içinde 90 mL Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck) bulunan stomacher poşetlerine aktarılmış ve stomacherde (Seward Stomacher®400 Circulator; İngiltere) 235 devirde 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir. 9 mL'lik MRD kullanılarak hazırlanan uygun seyreltilerden, yayma yöntemiyle selektif besiyerlerine ekim yapılmıştır. *E. coli* O157:H7 sayımı için Sorbitol

MacConkey Agar'a (SMAC, Merck) ekim yapıp 37 °C'da 24 saat, *L. monocytogenes* sayımı için PALCAM Agar'a (Merck) ekim yapıp 37 °C'da 48 saat, *Staphylococcus* spp. sayımı için Baird Parker Agar'a (BPA, Merck) ekim yapıp 37 °C'da 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. LAB sayımı için çift tabaka tekniği kullanılarak De Man Rogosa Sharp Agar'a (MRS, Merck) ekim yapılmış ve 30 °C'da 72 saat inkübe edilmiştir (Anonymous 2005).

3.2.9 Sucuklarda kimyasal analizler

3.2.9.1 pH değerinin belirlenmesi

10 g sucuk örneği üzerine 100 ml saf su ilave edilerek homojenize edilmiş ve karışımın pH'sı İmolab (level 2) marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür (AOAC 2000).

3.2.9.2 Nem miktarının belirlenmesi

Boş kuru madde kapları, 105 °C'da en az iki saat tutularak sabit ağırlığa getirilmiştir. Desikatöre alınıp oda sıcaklığına soğutulmuş ve hassas terazide 0,0001g hassasiyetle darası alınmıştır. Daha sonra kuru madde kaplarına yaklaşık 5 g örnek koyularak tartılmıştır. Örnekler 105 °C'da yaklaşık 18 saat süreyle, sabit ağırlık elde edilinceye kadar kurutulmuştur. Desikatöre alınarak oda sıcaklığına soğutulup tartılmıştır. Örnekteki nem miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (AOAC 2000).

$$\% \text{ Kuru madde} = (B/A) \times 100$$

$$\% \text{ Nem} = 100 - \% \text{ kuru madde}$$

A : Örneğin yaş ağırlığı (g)

B : Örneğin kuru ağırlığı (g)

3.2.10 İstatistik analiz

Üzerinde durulan özellikler bakımından (farklı pH ve farklı adaptasyon süreleri) elde edilen bulgular faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile (repeated measurement ANOVA) analiz edilmiştir. Denemede muamele (pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon) ve saat (inkübasyon süresi) olmak üzere iki faktör bulunmaktadır. Tekrarlanan ölçümler saat faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Farklı grupların saptanmasında DUNCAN testi kullanılmıştır (Gürbüz vd. 2003). Varyans analizlerinde SPSS 15 paket programı ile DUNCAN testlerinde CMSTAT paket programı kullanılmıştır. ,

Tuz adaptasyonuna yönelik yürütülen denemelerde elde edilen bulgular faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir.. Farklı grupların saptanmasında DUNCAN testi kullanılmıştır (Gürbüz vd. 2003).

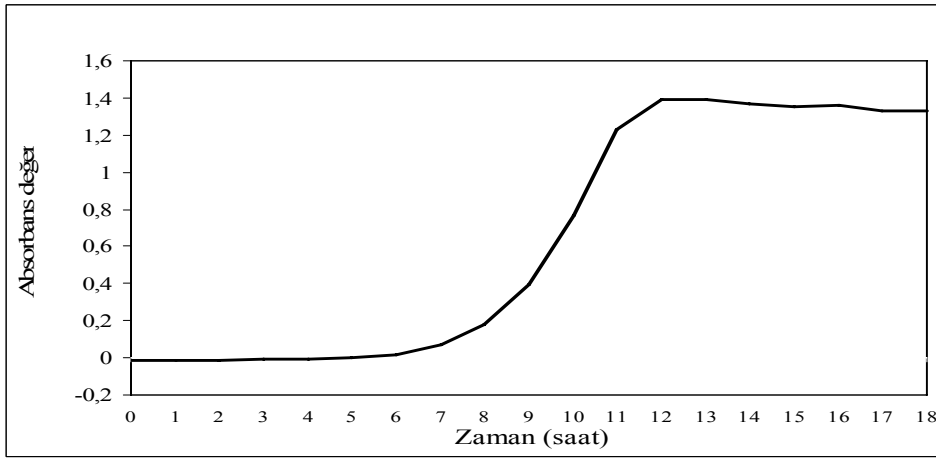
Sucuk örneklerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistik değerlendirmesi yapılmıştır. Üzerinde durulan özellik (*E. coli* O157:H7 sayısı, *L. monocytogenes* sayısı, pH ve nem) bakımından elde edilen gözlemler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiştir. Denemede uygulama faktörünün A (aside adapte edilmiş) ve K (aside adapte edilmemiş) olmak üzere 2 seviyesi, besiyeri faktörünün (BPA, MRS, SMAC, PALCAM) seviyesi ile gün faktörünün seviyeleri bulunmaktadır. Tekrarlanan ölçümler gün faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Farklı grupların saptanmasında Duncan testi kullanılmıştır (Gürbüz vd. 2003).

Saat faktörünün seviyelerinde fark olmayan deneme gruplarının karşılaştırılmasında ortalamalar dikkate alınmıştır.

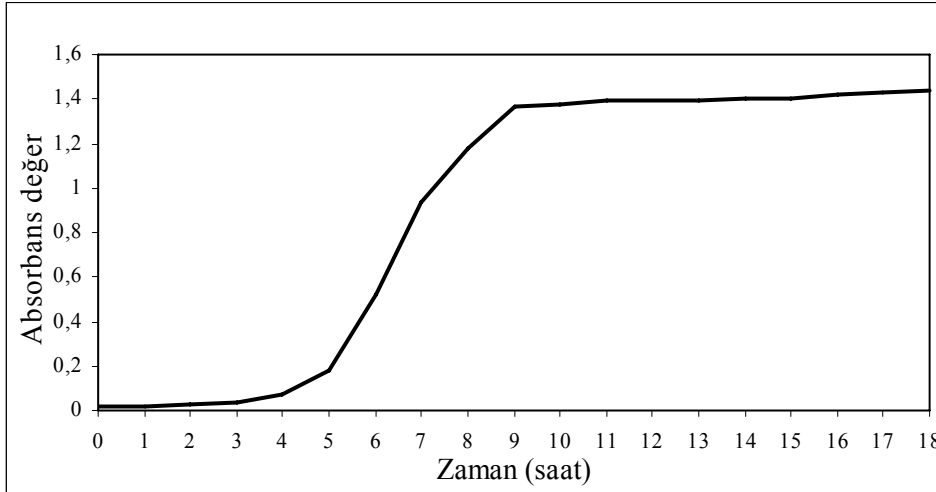
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin Gelişme Eğrisi

L. monocytogenes ve *E. coli* O157:H7'nin aktif kültüründen 50 mL TSB besiyerine 5 µL inoküle edildikten sonra 37 °C'da inkübe edilen kültürlerin absorbans değerleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 *L. monocytogenes*'in gelişme eğrisi



Şekil 4.2 *E. coli* O157:H7'nin gelişme eğrisi

Absorbans değerleri okunan kültürlerin başlangıç inokulasyon miktarlarının; *E. coli* O157:H7 için 4,76 log kob/mL, *L. monocytogenes* için 5,15 log kob/mL olduğu ve durma fazına girmiş kültürlerin ulaştığı maksimum sayının 10^9 kob/mL olduğu kültürel sayım yöntemiyle belirlenmiştir. *L. monocytogenes*'in 15 saatlik, *E. coli* O157:H7'nin 14 saatlik durma fazı kültürleri denemelerde kullanılmıştır.

4.2 *L. monocytogenes*'in HCl ile Aside Toleranslı Hale Getirilmesi

HCl kullanılarak pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar izelge 4.1'de verilmiştir. pH 4,5'te inkübe edilerek aside tolerans kazandırılan kültürlerin pH 2,5'te canlı kalma düzeyleri adaptasyon sürelerine bağlı olarak değişim göstermiştir. Aside tolerans kazandırılmayan (ATK⁻) deneme grubundaki bakteri sayısı, diğer deneme gruplarına kıyasla daha hızlı azalma eğilimi sergilemiştir. İnkübasyonun 3. saatinde en düşük canlı kalma düzeyine sahip ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı 2,33 log kob/mL düzeyine inerken, 3. deneme grubundaki bakteri sayısı 5,30 log kob/mL düzeyinde olup en yüksek değere sahiptir. ATK⁻ deneme grubunda 4 saatlik inkübasyon sonrasında canlı kalan bakteri sayısı <1,00 log kob/mL düzeyine inerken, aside tolerans kazandırılan deneme gruplarının tümünde canlı kalan bakteri sayısı ATK⁻ deneme grubundan daha yüksek bulunmuştur. İnkübasyonun 4. ve 5. saatinde en yüksek canlı kalma düzeyi 3. deneme grubunda tespit edilmiştir.

İstatistik analiz sonuçlarına göre; 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyona tabi tutulan deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubunda, inkübasyonun 0. ve 1. saatinde tespit edilen bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. İki saatlik inkübasyon sonunda ATK⁻ deneme grubu ile, aside adapte edilen deneme grupları arasındaki fark önemli bulunurken ($p<0,01$), aside adapte edilen deneme gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında ise gruplar arasında fark önemsiz bulunmuştur. İnkübasyonun 3. saatinde ise ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı ile diğer deneme grupları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,01$). İnkübasyonun 4. ve 5. saatinde en yüksek düzeyde aside tolerans kazanan grubun, 3 saat süreyle aside adapte edilen deneme grubu olduğu anlaşılmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.1 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,02A ^a ±0,06	7,00A ^a ±0,04	7,02A ^a ±0,14	7,05A ^a ±0,22	7,06A ^a ±0,21
1	6,21B ^a ±0,06	6,23B ^a ±0,05	6,27B ^a ±0,07	6,10B ^a ±0,02	5,60B ^a ±0,06
2	5,78B ^a ±0,38	5,98B ^a ±0,28	5,91B ^a ±0,17	5,95B ^a ±0,10	4,48C ^b ±0,33
3	4,03C ^b ±0,26	4,65C ^{ab} ±0,00	5,30C ^a ±0,44	4,71C ^{ab} ±0,78	2,33D ^c ±0,10
4	3,42D ^{bc} ±0,24	3,00D ^c ±0,00	5,09C ^a ±0,44	4,08D ^b ±0,25	<1,00E ^d
5	2,08E ^b ±0,25	1,95E ^b ±0,00	3,42D ^a ±0,43	<1,00E ^c	<1,00E ^c

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon.

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'te aside toleransının arttığı belirlenmiştir. pH 2,5'e olan en yüksek tolerans 3 saatlik ATK süresinde gerçekleşmiştir.

1, 2, 3 ve 4 saat süreyle pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça bakteri sayısı azalmaktadır. 2 ve 3 saatlik inkübasyon sonrasında ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı diğer gruplara kıyasla daha düşüktür. İnkübasyonun 4. saatinde, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubundaki bakteri sayılarının sırasıyla 2,37; 2,78; 3,58 ve 3,49 log kob/mL olduğu, ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısının ise 1,00 log kob/mL düzeyinin altına düştüğü görülmektedir.

Yapılan istatistik analiz sonucunda, aside adapte edilen deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunda, inkübasyonun 0. ve 1. saatinde bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 2 ve 3 saatlik inkübasyon sonunda, 1., 2., 3. ve 4. deneme gruplarının bakteri sayıları arasında fark yokken, bu grupların bakteri sayıları, ATK⁻ deneme grubundan daha yüksek bulunmuştur (p<0,01). İnkübasyonun 4. ve 5. saatinde

ise 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasında tespit edilen bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz olup, 1 ve 2 saatlik adaptasyon uygulamasından daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,01$). 1, 2, 3 ve 4 saatlik asit adaptasyon uygulaması *L. monocytogenes*'in aside olan toleransını arttırmıştır. En yüksek asit toleransı ise 3 ve 4 saatlik adaptasyonda elde edilmiştir ($p<0,01$).

Çizelge 4.2 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,32A ^a ±0,02	7,44A ^a ±0,08	7,49A ^a ±0,11	6,90A ^a ±0,60	7,06A ^a ±0,21
1	6,04B ^a ±0,11	6,07B ^a ±0,13	6,06B ^a ±0,21	5,90B ^a ±0,26	5,60B ^a ±0,06
2	5,43B ^a ±0,20	5,45B ^a ±0,27	5,58B ^a ±0,35	5,30B ^a ±0,15	4,48C ^b ±0,33
3	4,08C ^a ±0,20	4,43C ^a ±0,28	4,84C ^a ±0,21	4,44C ^a ±0,16	2,33D ^b ±0,10
4	2,37D ^c ±0,52	2,78D ^{bc} ±0,06	3,58D ^a ±0,40	3,49D ^{ab} ±0,45	<1,00E ^d
5	<1,00E ^b	<1,00E ^b	2,43E ^a ±0,20	2,46E ^a ±0,23	<1,00E ^b

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($p>0,01$)

pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. 4 saatlik inkübasyon sonunda ATK⁻ deneme grubunun bakteri sayısı 1,00 log kob/mL'nin altına düşerken, adaptasyon işlemine tabi tutulan deneme gruplarındaki bakteri sayısı 2,08 ile 4,48 log kob/mL arasındadır. Bakteri sayısı, inkübasyonun 5. saatinde, 1. ve 2. deneme grubunda 1,00 log kob/mL'nin altına düşerken, 3. deneme grubunda 2,70 log kob/mL ve 4. deneme grubunda 3,99 log kob/mL düzeyine inmiştir. En yüksek canlı kalma düzeyi 4 saatlik adaptasyon sonrasında elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,30A ^a ±0,07	7,28A ^a ±0,10	7,28A ^a ±0,08	7,18A ^a ±0,10	7,06A ^a ±0,21
1	6,17B ^a ±0,02	6,15B ^a ±0,11	5,92B ^a ±0,23	6,11B ^a ±0,13	5,60B ^b ±0,06
2	5,71C ^a ±0,05	5,41C ^a ±0,00	5,86B ^a ±0,02	5,87B ^a ±0,22	4,48C ^b ±0,33
3	3,84D ^c ±0,02	4,13D ^{bc} ±0,02	4,40C ^b ±0,00	5,34C ^a ±0,38	2,33D ^d ±0,10
4	2,08E ^d ±0,04	2,63E ^c ±0,20	3,36D ^b ±0,02	4,48D ^a ±0,33	<1,00E ^e
5	<1,00F ^c	<1,00F ^c	2,70E ^b ±0,22	3,99E ^a ±0,17	<1,00E ^c

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon
A,B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

pH 5,5'te aside adapte edilen deneme grupları ve ATK⁻ deneme grubunun pH 2,5'te inkübasyonunun 0. saatinde tespit edilen bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Bir saatlik inkübasyondan itibaren aside adapte edilen deneme gruplarındaki bakteri sayısı, ATK⁻ deneme grubundan daha yüksek olup istatistik açıdan önemli bulunmuştur (p<0,01). Adaptasyon süresi arttıkça bakterinin aside toleransının arttığı, en yüksek asit direncinin 4 saatlik adaptasyon sonrasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (p<0,01).

Son yıllarda *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, bu bakterilerde asidik ortamlara uyum sağlamalarına yarayan mekanizmaların olduğunu ortaya koymuştur. Bu patojen bakteriler orta derecede asitli ortamlara belirli bir süre maruz kalırsa spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamda canlılıklarını sürdürebilmektedir (Foster ve Hall 1990, Foster 1991, Leyer vd. 1995, O'driscoll vd. 1996, Riesenber vd. 1996).

Koutsoumanis ve Sofos (2004) tarafından, 4,0 ile 6,0 arasındaki pH'lara maruz bırakılan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un kuvvetli asit koşullarda yaşama düzeyleri tespit edilmiştir. Araştırma sonunda aside tolerans kazandırma ile

patojenlerin ölümcül asit koşullardan korunduğu ve aside karşı oluşan koruyuculuğun türe ve pH'ya bağımlı olduğu görülmüştür. 5,0 ile 6,0 arasındaki pH'larda *L. monocytogenes*'in asit direncinin arttığı, en yüksek direncin pH 5,5'te gerçekleştiği belirtilmiştir. Araştırmamızda, pH 3,0'da *L. monocytogenes*'in yaşama oranı üzerinde pH 4,5; 5,0 ve 5,5'teki adaptasyon aynı oranda artışa neden olmuş, pH 2,5'teki yaşama oranı üzerinde en yüksek artış pH 4,5'te gerçekleştirilen adaptasyonda elde edilmiştir.

Foster (1991) tarafından *S. Typhimurium* üzerinde yürütülen çalışmada, ATK'nin indüklenmesinde en uygun pH'nın 5,8-6,0 aralığında olduğunu saptamıştır. Bu araştırma da, pH 4,5- 5,5 aralığında gerçekleştirilen adaptasyonla ATK'nin indüklendiği tespit edilmiştir. Patojen bakterilerin asidik ortamlara adapte olması, hem insan vücudundaki mide sıvısında hem de asidik gıdalarda yaşama olasılığını arttırmaktadır. Araştırmamızda, *L. monocytogenes*'in HCl ile aside adapte olarak pH 2,5'te yaşama oranının arttığı tespit edilmiştir. Bu patojenin bu kadar kuvvetli asit koşullarda canlılığını sürdürüyor olması, insan midesinde (pH 1,5-2,5) uzun süre canlı kalabileceğini ve bağırsağa canlı olarak geçebileceğini işaret etmektedir.

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.4'te verilmiştir. HCl kullanılarak pH 4,5; pH 5,0 ve pH 5,5'te gerçekleştirilen 1, 2 ve 3 saatlik adaptasyon uygulaması *L. monocytogenes*'in pH 2,5'e olan direncini arttırmıştır ($p<0,05$). pH 4,5'te aside adapte edilen deneme grubunun yaşama oranı pH 5,0 ve pH 5,5'te aside adapte edilen deneme grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). pH 5,0 ve pH 5,5'te aside adapte edilen deneme grubu arasındaki fark istatistik açıdan önemsizdir.

HCl kullanılarak pH 4,5; pH 5,0 ve pH 5,5'te gerçekleştirilen 4 saatlik asit adaptasyon uygulaması *L. monocytogenes*'in pH 2,5'e olan direncini arttırmıştır ($p<0,05$). Dört saatlik adaptasyon uygulamasında, en yüksek canlı kalma düzeyinin pH 5,5'te gerçekleştiği görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 2,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnkübasyon süresi (saat)								
pH	Deneme	0	1	2	3	4	5	Ort.
4,5		7,02 ^A ±0,06	6,21 ^A ±0,06	5,78 ^A ±0,38	4,03 ^A ±0,26	3,42 ^A ±0,24	2,08 ^A ±0,25	4,75±0,52
5,0	1	7,32 ^A ±0,02	6,04 ^A ±0,11	5,43 ^A ±0,20	4,08 ^A ±0,200	2,37 ^B ±0,52	1,00 ^B ±0,00	4,37±0,74
5,5		7,30 ^A ±0,07	6,17 ^A ±0,02	5,71 ^A ±0,05	3,84 ^A ±0,02	2,08 ^B ±0,04	1,00 ^B ±0,00	4,35±0,76
	Ort.	7,21±0,07	6,14±0,05	5,64±0,13	3,98±0,10	2,62±0,30	1,36±0,44	
4,5		7,00 ^B ±0,04	6,23 ^A ±0,05	5,98 ^A ±0,28	4,65 ^A ±0,00	3,00 ^A ±0,00	1,95 ^A ±0,00	4,80±0,63
5,0	2	7,44 ^A ±0,08	6,07 ^A ±0,13	5,45 ^B ±0,27	4,43 ^{AB} ±0,28	2,78 ^A ±0,06	1,00 ^B ±0,00	4,53±0,73
5,5		7,28 ^{AB} ±0,10	6,15 ^A ±0,11	5,41 ^B ±0,00	4,13 ^B ±0,02	2,63 ^A ±0,20	1,00 ^B ±0,00	4,43±0,73
	Ort	7,24±0,09	6,15±0,05	5,61±0,15	4,40±0,12	2,80±0,09	1,32±0,21	
4,5		7,02 ^A ±0,14	6,27 ^A ±0,07	5,91 ^A ±0,17	5,30 ^A ±0,44	5,09 ^A ±0,44	3,42 ^A ±0,43	5,50±0,35
5,0	3	7,49 ^A ±0,11	6,06 ^A ±0,21	5,58 ^A ±0,35	4,84 ^{AB} ±0,21	3,58 ^B ±0,40	2,43 ^B ±0,20	4,99±0,50
5,5		7,28 ^A ±0,08	5,92 ^A ±0,23	5,86 ^A ±0,02	4,40 ^B ±0,00	3,36 ^B ±0,02	2,70 ^{AB} ±0,22	4,92±0,48
	Ort.	7,26±0,10	6,08±0,10	5,78±0,12	4,85±0,21	4,01±0,38	2,85±0,23	
4,5		7,05 ^A ±0,22	6,10 ^A ±0,02	5,95 ^A ±0,10	4,71 ^A ±0,78	4,08 ^{AB} ±0,25	1,00 ^C ±0,00	4,81±0,60
5,0	4	6,90 ^A ±0,60	5,90 ^A ±0,26	5,30 ^A ±0,15	4,44 ^A ±0,16	3,49 ^B ±0,45	2,46 ^B ±0,23	4,75±0,46
5,5		7,18 ^A ±0,10	6,11 ^A ±0,13	5,87 ^A ±0,22	5,34 ^A ±0,38	4,48 ^A ±0,33	3,99 ^A ±0,17	5,49±0,33
	Ort.	7,04±0,17	6,03±0,09	5,71±0,15	4,83±0,28	4,02±0,24	2,48±0,55	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (¹) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. 5 saatlik inkübasyon sonunda, ATK⁻ deneme grubunun canlı kalma düzeyinin, diğer gruplara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. 5 saatlik inkübasyon sonunda bakteri sayısı, ATK⁻ deneme grubunda 3,11 log kob/mL azalırken, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubunda sırasıyla 1,54; 1,31; 1,04 ve 1,48 log kob/mL azalmıştır. Adaptasyon işleminin gerçekleştirildiği deneme gruplarının tümünde canlı kalma düzeyi, ATK⁻ deneme grubuna kıyasla daha yüksektir.

İstatistiksel değerlendirme sonucunda, 3, 4 ve 5 saatlik inkübasyon sonrasında, aside adapte edilen tüm deneme gruplarında tespit edilen bakteri sayısının, ATK⁻ deneme grubundan yüksek olduğu saptanmıştır (p<0,01). Aside adapte edilen deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark ise önemsiz bulunmuştur. 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulaması sonucunda *L. monocytogenes*'in asit toleransı artmıştır (p<0,01).

Çizelge 4.5 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				ATK ⁻
	ATK ⁺ süresi (saat)				
	1	2	3	4	
0	7,41A ^a ±0,05	7,23A ^{ab} ±0,19	7,06A ^{ab} ±0,10	6,93A ^b ±0,35	7,28A ^{ab} ±0,08
1	6,47B ^a ±0,13	6,32B ^{ab} ±0,02	6,28B ^{ab} ±0,00	6,06B ^b ±0,10	6,25B ^{ab} ±0,21
2	6,25B ^a ±0,02	6,23BC ^a ±0,05	6,22B ^a ±0,04	6,02B ^{ab} ±0,07	5,67C ^b ±0,06
3	6,19BC ^a ±0,01	6,15BC ^a ±0,04	6,16B ^a ±0,05	5,82B ^a ±0,11	5,18D ^b ±0,03
4	6,10BC ^a ±0,02	6,06BC ^a ±0,02	6,12B ^a ±0,04	5,76BC ^a ±0,14	4,56E ^b ±0,15
5	5,87C ^a ±0,12	5,92C ^a ±0,04	6,02B ^a ±0,02	5,45C ^a ±0,15	4,17F ^c ±0,38

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk. İnkübasyon
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

pH 5,0'da 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Deneme grupları karşılaştırıldığında, adaptasyon işleminin *L. monocytogenes*'in pH 3,0'da canlı kalma düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. 5 saatlik inkübasyon sonunda, ATK⁻ deneme grubunun bakteri sayısı 3,11 log kob/mL azalırken, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubundaki bakteri sayıları sırasıyla 1,76; 2,03; 1,63 ve 1,69 log kob/mL azalmıştır.

pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunda pH 3,0'da inkübasyonun 0. ve 1. saatinde bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. İnkübasyonun 3. 4. ve 5. saatinde ATK⁻ deneme grubu ile aside adapte edilen deneme grupları arasındaki fark önemli bulunurken (p<0,01), aside adapte edilen

deneme grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon süresi *L. monocytogenes*'in aside toleransını arttırmıştır. Farklı adaptasyon süreleri direnç artışı üzerinde farklı etkiler oluşturmamıştır.

Çizelge 4.6 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,30A ^a ±0,12	7,18A ^a ±0,14	7,29A ^a ±0,09	7,19A ^a ±0,01	7,28A ^a ±0,08
1	6,35B ^a ±0,05	6,25B ^a ±0,02	6,35B ^a ±0,09	6,26B ^a ±0,08	6,25B ^a ±0,21
2	6,22BC ^a ±0,04	6,19B ^{ab} ±0,01	6,16B ^{ab} ±0,08	6,14BC ^{ab} ±0,10	5,67C ^b ±0,06
3	6,02BC ^a ±0,06	6,08BC ^a ±0,08	6,08BC ^a ±0,04	6,03BC ^a ±0,05	5,18D ^b ±0,03
4	5,78CD ^a ±0,21	5,63C ^a ±0,22	5,95BC ^a ±0,02	5,70CD ^a ±0,19	4,56E ^b ±0,15
5	5,54D ^a ±0,46	5,15D ^a ±0,22	5,66C ^a ±0,28	5,50D ^a ±0,35	4,17E ^b ±0,38

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (↔) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. pH 3,0'da 5 saatlik inkübasyon sonrasında 1., 2., 3. ve 4. deneme grubundaki bakteri sayıları sırasıyla 1,48; 1,31; 1,58 ve 1,70 log kob/mL azalırken, ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı 3,11 log kob/mL azalmıştır. pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan deneme gruplarının, ATK⁻ deneme grubuna kıyasla canlı kalma düzeylerinin daha yüksek olduğu ve asit adaptasyonu ile *L. monocytogenes*'in kuvvetli asidik koşullarda yaşama oranının arttığı tespit edilmiştir.

pH 5,5'te aside adapte edilen deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunun pH 3,0'daki inkübasyonun 0. ve 1. saatinde bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. İnkübasyonun 2., 3., 4. ve 5. saatinde ATK⁻ deneme grubunun bakteri sayısı, aside adapte edilen deneme gruplarından daha düşük olup bu farklılık istatistik açıdan önemli bulunmuştur (p<0,01). Aside adapte edilen deneme grupları arasındaki fark ise istatistik

açından önemsizdir. Sonuç olarak, pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon işlemi *L. monocytogenes*'in aside olan direncinde artışa neden olmuştur. Farklı adaptasyon süreleri direnç artışı üzerinde farklı etkiler oluşturmamıştır.

Çizelge 4.7 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,29A ^a ±0,11	7,35A ^a ±0,09	7,36A ^a ±0,02	7,28A ^a ±0,05	7,28A ^a ±0,08
1	6,36B ^a ±0,02	6,66B ^a ±0,28	6,27B ^a ±0,01	6,64B ^a ±0,01	6,25B ^a ±0,21
2	6,23B ^a ±0,03	6,58B ^a ±0,32	6,20B ^a ±0,00	6,28BC ^a ±0,10	5,67C ^b ±0,06
3	6,12BC ^a ±0,04	6,18C ^a ±0,03	6,12BC ^a ±0,04	6,15C ^a ±0,15	5,18D ^b ±0,03
4	6,02BC ^a ±0,07	6,07C ^a ±0,12	5,95BC ^a ±0,10	5,93CD ^a ±0,35	4,56E ^b ±0,15
5	5,81C ^a ±0,09	6,04C ^a ±0,12	5,78C ^a ±0,10	5,58D ^a ±0,36	4,17F ^b ±0,38

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Phan-Thanh vd. (2000) tarafından asit stresinden önce *L. monocytogenes* LO28 suşu pH 5,5'te birkaç saat HCl'ye adapte edilmiştir. pH 3,7'ye olan en yüksek toleransın 2 ve 3 saatlik adaptasyonda gerçekleştiği, adaptasyon süresi 24 saate uzatıldığında asit toleransının azaldığı rapor edilmiştir. *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonuna yönelik yürütülen bu çalışmada ise, pH 2,5'e olan en yüksek tolerans 4 saatlik adaptasyonda, pH 3,0'a olan tolerans ise 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyonda elde edilmiştir.

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.8'de verilmiştir. HCl kullanılarak pH 4,5; 5,0 ve pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in pH 3,0'a olan direncini arttırmıştır (p<0,01). Fakat pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te adapte edilen deneme gruplarının canlı kalma düzeyleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

Koutsoumanis vd. (2003), pH'sı 5,0; 5,5 ve 6,0 olan glukoz içeren TSB'de 90 dakika süreyle gerçekleştirilen adaptasyon uygulaması ile *L. monocytogenes*'in asit direncinin arttığını, fakat pH 4,0; 4,5 ve 7,0'de gerçekleştirilen adaptasyonun asit direncinde artışa neden olmadığını saptamışlardır. *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonuna yönelik yürütülen bu çalışmada ise, pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te gerçekleştirilen asit adaptasyonu, *L. monocytogenes*'in, daha kuvvetli asit koşullarda yaşama oranını arttırmıştır.

Çizelge 4.8 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

pH	Deneme	İnkübasyon süresi (saat)						Ort.
		0	1	2	3	4	5	
4,5		7,41±0,05	6,47±0,13	6,25±0,02	6,19±0,01	6,10±0,02	5,87±0,12	6,38±0,15
5,0	1	7,30±0,12	6,35±0,05	6,22±0,04	6,02±0,06	5,78±0,21	5,54±0,46	6,20±0,18
5,5		7,29±0,11	6,36±0,02	6,23±0,03	6,12±0,04	6,02±0,07	5,81±0,09	6,30±0,14
	Ort	7,33 ^A ±0,05	6,39 ^B ±0,04	6,23 ^{BC} ±0,01	6,11 ^{CD} ±0,04	5,96 ^D ±0,08	5,74 ^E ±0,14	
4,5		7,23±0,19	6,32±0,02	6,23±0,05	6,15±0,04	6,06±0,02	5,92±0,04	6,32±0,13
5,0	2	7,18±0,14	6,25±0,02	6,19±0,01	6,08±0,08	5,63±0,22	5,15±0,22	6,08±0,19
5,5		7,35±0,09	6,66±0,28	6,58±0,32	6,18±0,03	6,07±0,12	6,04±0,12	6,48±0,15
	Ort	7,25 ^A ±0,07	6,41 ^B ±0,11	6,33 ^{BC} ±0,11	6,13 ^{CD} ±0,03	5,92 ^{DE} ±0,11	5,70 ^E ±0,19	
4,5		7,06±0,10	6,28±0,00	6,22±0,04	6,16±0,05	6,12±0,04	6,02±0,02	6,31±0,11
5,0	3	7,29±0,09	6,35±0,09	6,16±0,08	6,08±0,04	5,95±0,02	5,66±0,28	6,25±0,16
5,5		7,36±0,02	6,27±0,01	6,20±0,00	6,12±0,04	5,95±0,10	5,78±0,10	6,28±0,16
	Ort	7,24 ^A ±0,07	6,30 ^B ±0,03	6,19 ^{BC} ±0,03	6,12 ^{CD} ±0,02	6,00 ^D ±0,04	5,82 ^E ±0,10	
4,5		6,93±0,35	6,06±0,10	6,02±0,07	5,82±0,11	5,76±0,14	5,45±0,15	6,01±0,15
5,0	4	7,19±0,01	6,26±0,08	6,14±0,10	6,03±0,05	5,70±0,19	5,50±0,35	6,14±0,17
5,5		7,28±0,05	6,64±0,01	6,28±0,10	6,15±0,15	5,93±0,35	5,58±0,36	6,31±0,18
	Ort	7,13 ^A ±0,11	6,32 ^B ±0,113	6,14 ^{BC} ±0,06	6,00 ^{CD} ±0,08	5,79 ^{DE} ±0,12	5,51 ^E ±0,14	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (↔) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. pH 4,5'te gerçekleştirilen adaptasyon denemelerinde, 5 saatlik inkübasyon sonrasındaki bakteri sayısı, 1 saatlik adaptasyonda 1,57; 2 saatlik adaptasyonda 1,05; 3 saatlik adaptasyonda 1,73; 4 saatlik adaptasyonda 0,97 log kob/mL ve ATK⁻ deneme grubunda 1,25 log kob/mL azalmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki farkın istatistik açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1 saat	2 saat	3 saat	4 saat	
0	7,40	7,21	7,16	6,64	7,31
1	7,25	6,82	6,75	6,35	7,17
2	7,02	6,55	6,27	6,29	7,01
3	6,71	6,40	6,10	6,00	6,74
4	6,25	6,32	6,06	5,85	6,32
5	5,83	6,16	5,43	5,67	6,06
Ort.	6,74A±0,18	6,57A±0,11	6,29A±0,18	6,13A±0,10	6,77A±0,14

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Ort: Ortalama

A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,0'da 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı, 5 saatlik inkübasyon sonunda sırasıyla 1,11; 1,17; 1,13; 1,24 ve 1,25 log kob/mL azalmıştır. Gruplar arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. pH 5,0'da gerçekleştirilen asit adaptasyon uygulamaları pH 3,5'te yaşama oranı üzerinde önemli bir etki oluşturmamıştır.

Çizelge 4.10 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1 saat	2 saat	3 saat	4 saat	
0	7,19	7,25	7,23	7,22	7,31
1	7,12	7,08	7,13	7,04	7,17
2	6,70	6,61	6,53	6,45	7,01
3	6,38	6,58	6,46	6,14	6,74
4	6,12	6,17	6,17	6,02	6,32
5	6,08	6,08	6,10	5,98	6,06
Ort.	6,60A±0,14	6,63A±0,14	6,60A±0,14	6,47A±0,15	6,77A±0,14

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir. Beş saatlik inkübasyon sonunda, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubuyla ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 1,03; 1,24; 1,23; 1,40 ve 1,25 log kob/mL azalmıştır. Yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre, deneme grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. pH 5,5'te gerçekleştirilen asit adaptasyon uygulamaları, *L. monocytogenes*'in pH 3,5'te yaşama oranı üzerinde artışa neden olmamıştır.

Çizelge 4.11 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1 saat	2 saat	3 saat	4 saat	
0	7,21	7,41	7,36	7,31	7,31
1	7,10	7,21	7,21	7,10	7,17
2	6,61	6,66	6,85	6,44	7,01
3	6,49	6,54	6,63	6,29	6,74
4	6,21	6,39	6,23	6,13	6,32
5	6,18	6,17	6,13	5,91	6,06
Ort.	6,63A±0,12	6,73A±0,14	6,73A±0,14	6,53A±0,16	6,77A±0,14

*Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.12'de verilmiştir. HCl kullanılarak pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in pH 3,5'e olan direncinde artışa neden olmamıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, pH 4,5; 5,0 ve 5,5'teki canlı kalma düzeyleri arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.12 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnkübasyon süresi (saat)								
pH	Deneme	0	1	2	3	4	5	Ort.
4,5	1	7,40	7,25	7,02	6,71	6,25	5,83	6,74±0,18
5,0		7,19	7,12	6,70	6,38	6,12	6,08	6,60±0,14
5,5		7,21	7,10	6,61	6,49	6,21	6,18	6,63±0,12
Ort		7,26 ^A ±0,07	7,15 ^A ±0,07	6,77 ^B ±0,14	6,52 ^B ±0,10	6,19 ^C ±0,05	6,03 ^C ±0,10	
4,5	2	7,21	6,82	6,55	6,40	6,32	6,16	6,57±0,11
5,0		7,25	7,08	6,61	6,58	6,17	6,08	6,63±0,14
5,5		7,41	7,21	6,66	6,54	6,39	6,17	6,73±0,14
Ort		7,29 ^A ±0,04	7,03 ^B ±0,08	6,61 ^C ±0,06	6,50 ^C ±0,07	6,29 ^D ±0,06	6,13 ^E ±0,04	
4,5	3	7,16	6,75	6,27	6,10	6,06	5,43	6,29±0,18
5,0		7,23	7,13	6,53	6,46	6,17	6,10	6,60±0,14
5,5		7,36	7,21	6,85	6,63	6,23	6,13	6,73±0,14
Ort		7,25 ^A ±0,05	7,03 ^A ±0,10	6,54 ^B ±0,15	6,40 ^{BC} ±0,14	6,15 ^{CD} ±0,05	5,89 ^D ±0,17	
4,5	4	6,64	6,35	6,29	6,00	5,85	5,67	6,130±0,104
5,0		7,22	7,04	6,45	6,14	6,02	5,98	6,47±0,154
5,5		7,31	7,10	6,44	6,29	6,13	5,91	6,53±0,159
Ort		7,06 ^A ±0,15	6,83 ^B ±0,16	6,40 ^C ±0,08	6,14 ^D ±0,07	6,00 ^{DE} ±0,07	5,85 ^E ±0,09	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

L. monocytogenes'in düşük pH'ya olan direncinin gelişme ortamının bileşimine, bakteri suşuna, gelişim fazına ve kullanılan asit tipine bağlı olduğu belirtilmiştir (Phan-Thanh vd. 2000). Vialette vd. (2003) ise *L. monocytogenes*'in klinik izolatlarının asit ve ozmotik stres gibi olumsuz koşullara adaptasyon yeteneklerinin gıda izolatlarına kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Berk vd. (2005), insanlardan izole edilen *S. Typhimurium* suşların asit direncinin, gıda izolatlarından daha yüksek olduğunu,

Lou ve Yousef (1997) yürüttükleri denemede, pH 4,5 ve pH 5,0'da 1 saatlik adaptasyon ile logaritmik fazdaki *L. monocytogenes* Scott A suşunun pH 3,5'e olan direncinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca pH 5,0'da gerçekleştirilen adaptasyonun pH 4,5'ten daha yüksek düzeyde koruma sağladığı ifade edilmiştir. O'Driscoll vd. (1996) yaptığı çalışmada, *L. monocytogenes*'in durma fazı hücrelerinin doğal olarak pH değişimlerine (pH 3,5) karşı dirençli olduğu, fakat logaritmik faz hücrelerinin pH 3,5'te canlılığını sürdürebilmesi için pH'sı 5,5'e sahip ortamda aside adapte edilerek ATK yanıtını indüklenmesinin şart olduğu ifade edilmiştir. Lee vd. (1994) tarafından *S. Typhimurium* üzerinde yapılan çalışmada, bu bakterinin durma faz hücrelerinin pH 3,0'a olan toleransının, logaritmik faz hücrelerinden 1000 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde, HCl ile pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyon uygulaması, *L. monocytogenes*'in pH 2,5 ve 3,0'a olan direncinde artışa neden olurken, pH 3,5'te yaşama oranında artışa neden olmamıştır.

4.3 *L. monocytogenes*'in Organik Asitler ile Aside Tolerans Kazandırılması

Asetik, laktik ve sitrik asit kullanılarak pH'sı 4,5; 5,0 ve 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside tolerans kazandırılmış *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyleri tespit edilmiştir.

Asetik asit kullanılarak pH 4,5'te aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.13'te verilmiştir. Tablo incelendiğinde ATK⁻ deneme grubunda inkübasyonun 30. dakikasında tespit edilen bakteri sayısı 4,16 log kob/mL iken, aside tolerans kazandırılan deneme gruplarındaki bakteri sayısının 1,00 log kob/mL'nin altına düştüğü görülmektedir. İstatistiksel

değerlendirme sonucunda, asetik aside adaptasyon denemeleri bakterinin aside olan direncinde artışa neden olmamıştır. Ilımlı asit koşullara muamele, *L. monocytogenes*'in asetik aside olan direncinde azalmaya neden olmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.13 pH 4,5'te asetik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				ATK ⁻
	ATK ⁺ süresi (saat)				
	1	2	3	4	
0	7,00A ^a ±0,19	6,67A ^b ±0,10	6,58A ^{bc} ±0,15	6,32A ^c ±0,17	7,19A ^a ±0,08
30	<1,00B ^b	<1,00B ^b	<1,00B ^b	<1,00B ^b	4,16B ^a ±0,05
60	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a
90	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a
120	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk: Dakika
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($p>0,01$)

Çoğu gıdanın asidik pH'sı, gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini önleyen en önemli faktörlerden birisidir. Organik asitler; gıda bileşiminde doğal olarak, fermentasyon sonucu ya da katkı maddesi olarak bulunabilirler. Mayonez, ketçap, yoğurt, meyve suları ve salata sosu gibi asidik gıdalarda bulunan organik asitler patojenler üzerinde antimikrobiyel etki yapmaktadır (Weagant vd. 1994, Tsai ve Ingham 1997, Bang ve Drake 2005). Bu araştırmada, asetik asidin *L. monocytogenes* üzerinde inhibitör etki gösterdiği, asetik asitte gerçekleştirilen adaptasyonla patojenin bu aside olan duyarlılığının arttığı saptanmıştır. Elde edilen bu bulgu, hem gıda güvenliği hem de insan sağlığı açısından son derece önemlidir.

Asetik asit kullanılarak pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmiştir. pH 5,0'da gerçekleştirilen adaptasyon denemelerinde, 30 dakikalık inkübasyon sonunda 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 3,28; 3,51; 4,32; 2,91 ve 3,03 log kob/mL azalmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, 2 ve 3

saatlik adaptasyon uygulamasının *L. monocytogenes*'in asetik aside olan duyarlılığını arttırdığı görülmüştür ($p<0,01$).

Çizelge 4.14 pH 5,0'da asetik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,36A ^a ±0,04	7,22A ^a ±0,04	7,44A ^a ±0,18	7,29A ^a ±0,09	7,19A ^a ±0,08
30	4,08B ^b ±0,04	3,71B ^c ±0,04	3,12B ^d ±0,12	4,38B ^a ±0,10	4,16B ^{ab} ±0,05
60	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a
90	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a
120	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($p>0,01$)

Asetik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon sonunda 1.; 2.; 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 3,17; 3,41; 3,07; 3,83 ve 3,03 log kob/mL azalmıştır. İnkübasyonun 60. dakikasında deneme gruplarındaki bakteri sayısı <1,00 log kob/mL düzeyine inmiştir. pH 5,5'te gerçekleştirilen asetik aside adaptasyon uygulaması *L. monocytogenes*'in aside direncini arttırmamıştır. Deneme gruplarının bakteri sayılarının ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Laktik asit kullanılarak pH 4,5'te aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir. Laktik aside tolerans kazandırılan deneme gruplarında, 120 dakikalık inkübasyon sonrasında bakteri sayısı, 1 saatlik adaptasyonda 3,28; 2 saatlik adaptasyonda 2,98; 3 saatlik adaptasyonda 2,12; 4 saatlik adaptasyonda 1,91 ve ATK⁻ deneme grubunda ise 2,77 log kob/mL azalmıştır. 120 dakikalık inkübasyon sonrasında, aside adapte edilen deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısındaki farklılık istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.15 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,20	7,55	7,28	7,03	7,19
30	4,03	4,14	4,21	3,20	4,16
Ort.	5,61A±0,92	5,84A±0,99	5,74A±0,89	5,11A±1,11	5,67A±0,88

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Çizelge 4.16 pH 4,5'te laktik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				ATK ⁻
	ATK ⁺ süresi (saat)				
	1	2	3	4	
0	7,10A ^a ±0,10	6,81A ^{ab} ±0,11	6,29A ^b ±0,11	5,49A ^c ±0,09	7,21A ^a ±0,03
30	6,96A ^a ±0,04	6,48A ^{ab} ±0,12	5,86A ^c ±0,14	4,79B ^d ±0,09	6,12B ^{bc} ±0,12
60	4,55B ^a ±0,32	4,30B ^a ±0,04	4,30B ^a ±0,10	4,27C ^a ±0,09	4,84C ^a ±0,21
90	4,47B ^{ab} ±0,32	4,15B ^{abc} ±0,04	3,97B ^{bc} ±0,12	3,83CD ^c ±0,04	4,74C ^a ±0,26
120	3,82C ^{ab} ±0,56	3,83B ^{ab} ±0,01	4,17B ^{ab} ±0,42	3,78D ^{ab} ±0,04	4,44C ^a ±0,29

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Laktik asit kullanılarak pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.17'de verilmiştir. Laktik asit adaptasyonunda 120 dakikalık inkübasyon sonrasında, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla; 3,40; 3,45; 3,29; 2,84 ve 2,77 log kob/mL azalmıştır. Deneme gruplarının canlı kalma düzeyleri karşılaştırıldığında, laktik asit adaptasyonunun *L. monocytogenes*'in canlı kalma düzeyinde artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. 120 dakikalık inkübasyon sonrasında grupların bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.17 pH 5,0'da laktik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,29A ^a ±0,06	7,25A ^b ±0,14	7,27A ^a ±0,01	7,12A ^a ±0,12	7,21A ^a ±0,03
30	7,25A ^a ±0,07	6,91A ^a ±0,30	7,21A ^a ±0,03	6,97A ^a ±0,08	6,12B ^b ±0,12
60	5,49B ^b ±0,50	4,89B ^b ±0,04	6,36B ^a ±0,25	4,78B ^b ±0,42	4,84C ^b ±0,21
90	4,20C ^a ±0,20	4,13BC ^a ±0,21	4,34C ^a ±0,26	4,24B ^a ±0,30	4,74C ^a ±0,26
120	3,89C ^a ±0,48	3,80C ^a ±0,39	3,98C ^a ±0,62	4,28B ^a ±0,13	4,44C ^a ±0,29

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Gahan vd. (1996) tarafından, laktik aside tolerans kazandırılmış *L. monocytogenes*'in, laktik asit içeren yoğurt ve cottage peyniri, sitrik asit içeren portakal suyu ve asetik asit içeren salata sosunda yaşama oranının arttığı belirlenmiştir. Leyer ve Johnson (1992), aside tolerans kazandırdıkları *S. Typhimurium*'un laktik, asetik ve propiyonik aside direnç kazandığını rapor etmişlerdir. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada, asetik ve laktik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in bu asitlere olan direncinde artış saptanamamıştır.

Laktik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir. pH 3,5'te 120 dakikalık inkübasyon sonrasında, 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle adaptasyona tabi tutulan deneme grubuyla ATK⁻ deneme grubunun bakteri sayısındaki azalma 3,47; 3,45; 3,06; 2,80; 2,77 log kob/mL düzeyindedir. Deneme grupları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. pH 5,5'te gerçekleştirilen asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in laktik aside olan direncini arttırmamıştır.

L. monocytogenes'te organik asitler kullanılarak yürütülen adaptasyon denemelerinde, asetik asit ve laktik asit kullanılarak pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te, 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in pH 3,5'e olan direncinde artışa neden olmamıştır.

Çizelge 4.18 pH 5,5'te laktik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,34	7,36	7,30	7,26	7,21
30	6,52	6,79	7,13	7,11	6,12
60	4,66	5,23	5,44	6,04	4,84
90	4,42	4,45	4,45	4,57	4,74
120	3,87	3,91	4,24	4,46	4,44
Ort.	5,36A±0,45	5,55A±0,45	5,71A±0,44	5,88A±0,41	5,47A±0,35

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Faleiro vd. (2003), farklı gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* suşları üzerinde yürüttükleri araştırmada, laktik asit kullanılarak pH'sı 5,5'e ayarlanmış ortamda 1, 2 ve 4 saat süreyle aside adapte edilen *L. monocytogenes* suşlarının pH 3,5'e olan dirençlerini belirlemişlerdir. Maksimum ATK yanıtı için gerekli adaptasyon süresinin suşlar arasında farklılık gösterdiği, asit direnci için 1 saatlik adaptasyonun yeterli olmadığı, peynir izolatlarında 2 saatlik, et izolatlarında ise 4 saatlik adaptasyonun en yüksek düzeyde asit direnci sağladığı tespit edilmiştir. Bu araştırmanın laktik asit adaptasyonuna yönelik yürütülen bölümünde, pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyon, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun laktik aside direncinde artışa neden olmamıştır. Suş farklılığı, adaptasyon üzerinde etkili olan en önemli faktörlerden birisidir.

Gıda sanayisinde yaygın olarak kullanılan asetik ve laktik asit gibi organik asitler *L. monocytogenes*'in ATK yanıtının indüklenmesine neden olmakta ve düşük pH'lı gıdalarda yaşama oranını arttırmaktadır. Düşük pH koşullarında yaşayabilme yeteneği bakterilerin gelişme fazına bağlı olarak değişim göstermektedir. Caggia vd. (2009) tarafından yürütülen çalışmada, laktik asit kullanılarak pH'sı 5,7'ye ayarlanmış ortamda 3 saatlik adaptasyon uygulamasına tabi tutulan logaritmik fazdaki *L. monocytogenes*'in pH 3,7'ye olan direncinin arttığı tespit edilmiştir. Lee vd. (1994) tarafından da durma fazı hücrelerinin ATK yanıtının logaritmik faz hücrelerinden farklı olduğu

gösterilmiştir. Tarafımızca yapılan bu araştırmada, laktik aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in durma fazı hücrelerinin laktik aside direnç kazanmadığı saptanmıştır.

Cataldo vd. (2007) tarafından, laktik asitle pH'sı 5,1'e ayarlanmış ortamda 1 saat aside adapte edilen logaritmik fazdaki *L. monocytogenes* hücrelerinin pH 3,5'teki yaşama düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. pH 3,5'te inkübasyonun 2. saatinde, logaritmik faz ATK^+ ; logaritmik faz ATK^- ve durma fazı ATK^- hücrelerinin canlı kalma düzeyleri sırasıyla %80; %20 ve %70 olarak hesaplanmıştır. Bu araştırma da ise, durma fazı ATK^- hücrelerinin canlı kalma düzeylerinin %62 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.

Ikeda vd. (2003), aside adapte edilmiş ve edilmemiş *L. monocytogenes* inoküle edilen taze sığır etleri, 30 saniye süreyle %2'lik asetik ve laktik asit solüsyonlarına daldırılmıştır. Asit adaptasyonu, *L. monocytogenes*'in bu uygulamalara olan direncinde artışa neden olmamıştır.

Gahan vd. (1996), laktik asit ile pH'sı 5,5'e ayarlanmış besiyerinde bir saat süreyle aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in erken logaritmik faz hücrelerinin pH 3,5'teki yaşama oranının arttığı rapor edilmiştir. O'Driscoll vd. (1996), pH 5,5'te laktik aside adapte edilen erken logaritmik fazdaki *L. monocytogenes*'in sayısında bir logaritma biriminden daha az düşüş olurken, aside adapte edilmeyen hücrelerde 3 logaritma birimi azalma olduğu görülmüştür. Durma fazı hücrelerinin kullanıldığı bu araştırma sonuçlarına göre (Çizelge 4.19), 120 dakikalık inkübasyon sonunda, 1 saatlik adaptasyonda 3,47; aside adapte edilmeyen deneme grubunda ise 2,77 log kob/mL düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak durma fazı hücrelerinin logaritmik faz hücrelerine kıyasla asidik koşulları daha iyi tolere edebildiği anlaşılmıştır.

Asit adaptasyonu; bakteri türüne, adaptasyon süresine ve asit çeşidine bağlı olarak değişim göstermektedir. Bir çalışmada HCl (pH 5,0), sitrik asit (pH 5,5) ve asetik asit (pH 5,5) ile asitlendirilmiş TSB'de 1, 3, 5 ve 10 saat aside adapte edilen *V. vulnificus*'un pH 3,5'te yaşama düzeyi tespit edilmiştir. HCl kullanımında pH 5,0'da 5 ve 10 saatlik adaptasyon direnç artışına neden olurken, 1 ve 3 saatlik adaptasyon direnç artışı sağlamamıştır. Sitrik asit adaptasyonu ile sitrik aside olan direncin arttığı, asetik asit

adaptasyonunun ise direnç artışına neden olmadığı belirlenmiştir. En yüksek ATK yanıtının, HCl kullanımında gerçekleştiği rapor edilmiştir (Bang ve Drake 2005).

Greenacre vd. (2003), *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un asit adaptasyonuna yönelik yürüttükleri çalışmada, asetik ve laktik asit adaptasyonunun türler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Asetik asit kullanımında optimum asit toleransının *L. monocytogenes*'te pH 5,5'te 3 saatlik, *S. Typhimurium*'da 2 saatlik adaptasyonda, laktik asit kullanımında ise *L. monocytogenes*'te pH 5,5'te 2 saatlik, *S. Typhimurium*'da ise 3 saatlik adaptasyon sonucunda gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu araştırmada ise, asetik ve laktik asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in bu asitlere olan direncini arttırmamış, *E. coli* O157:H7'de ise asetik asit kullanımında pH 5,5'te 3 saatlik, laktik asit kullanımında ise 3 ve 4 saatlik adaptasyonun en yüksek düzeyde direnç artışına neden olduğu belirlenmiştir.

Sitrik asit ile pH'sı 4,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside tolerans kazandırılmış *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir. Sitrik asit adaptasyon denemelerinde, 120 dakikalık inkübasyon sonrasında bakteri sayısı, 1 saatlik adaptasyonda 0,73; 2 saatlik adaptasyonda 0,33; 3 saatlik adaptasyonda 0,43; 4 saatlik adaptasyonda 0,91 log kob/mL azalmıştır. ATK⁻ deneme grubunda ise 1,14 log kob/mL azalma tespit edilmiştir.

İnkübasyonun 120. dakikasında, 1, 2 ve 3 saat süreyle sitrik aside adapte edilen deneme grubundaki bakteri sayısı, ATK⁻ deneme grubundan yüksek bulunmuştur (p<0,01). İki ve 3 saatlik adaptasyon denemeleri arasındaki fark istatistik açıdan önemsizken, en yüksek asit direnci 2 ve 3 saatlik adaptasyon denemelerinde elde edilmiştir (p<0,01).

Çizelge 4.19 pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,24A ^a ±0,09	7,35A ^a ±0,17	7,47A ^a ±0,06	7,50A ^a ±0,02	7,39A ^a ±0,01
30	7,08B ^a ±0,22	7,32A ^a ±0,17	7,42AB ^a ±0,08	7,19B ^a ±0,04	7,11B ^a ±0,21
60	7,06B ^a ±0,23	7,28A ^a ±0,17	7,33B ^a ±0,07	7,13B ^a ±0,05	6,93C ^a ±0,08
90	6,87C ^a ±0,22	7,10B ^a ±0,17	7,05C ^a ±0,06	7,10B ^a ±0,06	6,90C ^a ±0,06
120	6,51D ^a ±0,21	7,02B ^b ±0,17	7,04C ^b ±0,04	6,59C ^a ±0,05	6,25D ^a ±0,07

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Sitrik asit kullanılarak pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.20'da verilmiştir. Sitrik aside adaptasyon denemelerinde, ATK⁻ deneme grubunda 120 dakikalık inkübasyon sonunda canlılık kaybının 1,14 log kob/mL, 1.; 2.; 3. ve 4. deneme gruplarında ise sırasıyla, 1,55; 0,51; 0,52; 1,13 log kob/mL olduğu görülmüştür. 120 dakikalık inkübasyon sonrasında, 3 saat süreyle adaptasyona tabi tutulan deneme grubunda asit direncinin arttığı belirlenmiştir (p<0,05).

Çizelge 4.20 pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,21A ^a ±0,03	7,16A ^a ±0,12	7,32A ^a ±0,17	7,21A ^a ±0,06	7,39A ^a ±0,01
30	7,15A ^a ±0,04	7,12A ^a ±0,12	7,26A ^a ±0,18	7,08A ^a ±0,04	7,11AB ^a ±0,21
60	7,12A ^a ±0,04	7,08A ^a ±0,13	7,19A ^a ±0,19	7,04AB ^a ±0,04	6,93B ^a ±0,08
90	6,54B ^b ±0,13	7,06A ^a ±0,06	7,06AB ^a ±0,28	6,73B ^{ab} ±0,04	6,90B ^{ab} ±0,08
120	5,66C ^d ±0,13	6,65B ^{ab} ±0,08	6,80B ^a ±0,29	6,08C ^{cd} ±0,45	6,25C ^{bc} ±0,07

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Sitrik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.21'de verilmiştir. pH 5,5'te aside adaptasyon denemeleri sonucunda bakteri sayısı, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubunda sırasıyla 0,76; 0,79; 0,41 ve 0,87 log kob/mL, ATK⁻ deneme grubunda ise 1,14 log kob/mL azalmıştır. 120 dakikalık inkübasyon sonrasında, 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon denemelerinde tespit edilen bakteri sayısı, ATK⁻ deneme grubuna kıyasla daha yüksek olup istatistik açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05). En yüksek bakteri sayısı 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasında elde edilmiş olup, bu gruplar arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Sonuç olarak 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamaları bakterinin aside olan direncini arttırmıştır (p<0,05).

Çizelge 4.21 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				ATK ⁻
	ATK ⁺ süresi (saat)				
	1	2	3	4	
0	7,47A ^b ±0,06	7,85A ^a ±0,15	7,60A ^{ab} ± 0,14	7,91A ^a ±0,27	7,39A ^b ±0,01
30	7,28B ^{ab} ±0,05	7,47B ^{ab} ±0,02	7,57AB ^a ±0,16	7,33B ^{ab} ±0,13	7,11B ^b ±0,21
60	7,22B ^a ±0,04	7,45B ^a ±0,02	7,35BC ^a ±0,01	7,25BC ^{ab} ±0,14	6,93B ^b ±0,08
90	7,14B ^a ±0,06	7,18C ^a ±0,03	7,23C ^a ±0,03	7,18BC ^a ±0,14	6,90B ^a ±0,08
120	6,71C ^b ±0,22	7,06C ^{ab} ±0,09	7,19C ^a ±0,04	7,04C ^{ab} ±0,15	6,25C ^c ±0,07

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c (→)} Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.22'de verilmiştir. pH 4,5 ve pH 5,5'te 1 ve 2 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyon aynı düzeyde artışa neden olurken, direnç artışı pH 5,0'dan daha yüksektir. 3 ve 4 saat süreyle pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te gerçekleştirilen adaptasyonda gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

Bang ve Drake (2005), organik ve inorganik asitlerin bakterisidal ve bakteriyostatik etkilerinin birbirinden farklılık gösterdiği ve organik asitlerin inorganik asitlerden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca düşük moleküler ağırlıktaki organik asitlerin (asetik asit

gibi), yüksek moleküler ağırlıktaki organik asitlerden (sitrik asit gibi) daha etkili olduğu ifade edilmiştir. Vasseur vd. (1999), *L. monocytogenes* için asitlerin inhibitör etkisinin, asetik asit>laktik asit>HCl olarak, Sorelles vd. (1989) ise asetik asit>laktik asit>sitrik asit>HCl olarak belirlemiştir. Phan-Thanh vd. (2000), *L. monocytogenes*'in yaşama oranını, HCl varlığında %96 ve asetik asit varlığında %31 olarak saptamıştır. Bu araştırmada elde edilen veriler, yukarıda belirtilen araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuş olup, inhibitör etki asetik asit>laktik asit>sitrik asit>HCl olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.22 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnkübasyon süresi (dakika)						
pH Deneme	0	30	60	90	120	Ort.
4,5	7,24A ^a ±0,09	7,08A ^{ab} ±0,22	7,06A ^{ab} ±0,23	6,87AB ^b ±0,22	6,51A ^c ±0,21	6,95±0,11
5,0 1	7,21A ^a ±0,03	7,15A ^a ±0,04	7,12A ^a ±0,04	6,54B ^b ±0,13	5,66B ^c ±0,13	6,73±0,20
5,5	7,47A ^a ±0,06	7,28A ^{ab} ±0,05	7,22A ^{ab} ±0,04	7,14A ^b ±0,06	6,71A ^c ±0,22	7,16±0,09
Ort	7,30±0,06	7,17±0,07	7,13±0,07	6,85±0,13	6,29±0,22	
4,5	7,35B ^a ±0,17	7,32A ^a ±0,17	7,28A ^{ab} ±0,17	7,10A ^{bc} ±0,17	7,02A ^c ±0,17	7,21±0,08
5,0 2	7,16B ^a ±0,12	7,12A ^a ±0,12	7,08A ^a ±0,13	7,06A ^a ±0,06	6,65B ^b ±0,08	7,01±0,08
5,5	7,85A ^a ±0,15	7,47A ^b ±0,02	7,45A ^b ±0,02	7,18A ^c ±0,03	7,06A ^c ±0,09	7,40±0,09
Ort	7,45±0,15	7,30±0,08	7,27±0,09	7,11±0,05	6,91±0,10	
4,5	7,47±0,06	7,42±0,08	7,33±0,07	7,05±0,06	7,04±0,04	7,26±0,06
5,0 3	7,32±0,17	7,26±0,18	7,19±0,19	7,06±0,28	6,80±0,29	7,12±0,10
5,5	7,60±0,14	7,57±0,16	7,35±0,01	7,23±0,03	7,19±0,04	7,39±0,07
Ort	7,46±0,08	7,41±0,09	7,29±0,06	7,11±0,08	7,01±0,11	
4,5	7,50±0,02	7,19±0,04	7,13±0,05	7,10±0,06	6,59±0,05	7,10±0,10
5,0 4	7,21±0,06	7,08±0,04	7,04±0,04	6,73±0,04	6,08±0,45	6,82±0,15
5,5	7,91±0,27	7,33±0,13	7,25±0,14	7,18±0,14	7,04±0,15	7,34±0,12
Ort.	7,54±0,15	7,20±0,06	7,14±0,05	7,00±0,10	6,57±0,21	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (↔) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

4.4 *L. monocytogenes*'in Laktik Aside Karşı Çapraz Direncinin Belirlenmesi

Bölüm 4.2 ve 4.3'te belirtildiği üzere farklı organik ve inorganik asitler kullanılarak *L. monocytogenes* aside tolerans kazandırılmıştır. HCl ve sitrik asit kullanımıyla *L. monocytogenes*'in aside direnç kazandığı, asetik ve laktik asit kullanımının direnç artışına neden olmadığı belirlenmiştir. Laktik aside olan çapraz direncin belirlenmesi aşamasında, yalnızca direnç artışı sağlanan asitler üzerinde denemelere devam edilmiştir.

pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış TSB besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.23'te verilmiştir. Sitrik asitle yürütülen deneme sonucunda bakteri sayısı, 1 saatlik adaptasyonda 3,26; 2 saatlik adaptasyonda 3,55; 3 saatlik adaptasyonda 3,02; 4 saatlik adaptasyonda 3,11 ve ATK⁻ deneme grubunda 2,77 log kob/mL azalmıştır. pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunda 120 dakikalık inkübasyon sonrasında bakteri sayıları arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Sitrik aside adaptasyon uygulaması laktik aside olan çapraz direnci arttırmamıştır.

Çizelge 4.23 pH 4,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,37±0,05	7,60±0,08	7,35±0,05	7,23±0,23	7,21±0,03
30	7,26±0,11	7,14±0,18	7,32±0,04	7,11±0,19	6,12±0,12
60	5,73±0,22	5,07±0,47	5,11±0,42	5,38±0,02	4,84±0,21
90	4,41±0,18	4,35±0,24	4,36±0,28	4,32±0,38	4,74±0,26
120	4,11±0,12	4,05±0,10	4,33±0,50	4,12±0,49	4,44±0,29
Ort.	5,77A±0,46	5,64A±0,49	5,69A±0,47	5,63A±0,45	5,47A±0,35

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.24'te verilmiştir. pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in sayısında, 1 saatlik adaptasyonda 2,06; 2 saatlik adaptasyonda 1,95; 3 saatlik adaptasyonda 2,44; 4 saatlik adaptasyonda 2,17, ATK⁻ deneme grubunda ise 2,77 log kob/mL azalma tespit edilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre gruplar arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Adaptasyon işlemi *L. monocytogenes*'in laktik aside olan çapraz direncini arttırmamıştır.

Çizelge 4.24 pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,14	7,16	7,43	7,36	7,21
30	6,85	7,04	7,10	7,33	6,12
60	5,38	5,95	5,74	5,73	4,84
90	5,12	5,52	5,28	5,32	4,74
120	5,08	5,21	4,99	5,19	4,44
Ort.	5,91A±0,32	6,18A±0,31	6,11A±0,33	6,19A±0,33	5,47A±0,35

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25'te verilmiştir. pH 5,0'da sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in sayısı 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ve ATK⁻ deneme grubunda sırasıyla 2,98; 2,84; 3,04; 2,98 ve 2,77 log kob/mL azalmıştır. Deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Adaptasyon işlemi *L. monocytogenes*'in laktik aside olan çapraz direncini arttırmamıştır.

pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.26'da verilmiştir. 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ve ATK⁻ deneme

grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 2,78; 2,51; 2,14; 3,89 ve 2,77 log kob/mL azalmıştır. Deneme gruplarının bakteri sayılarının ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Adaptasyon işlemi *L. monocytogenes*'in laktik aside olan çapraz direncini arttırmamıştır.

Çizelge 4.25 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,35±0,12	7,22±0,11	7,30±0,19	7,31±0,11	7,21±0,03
30	6,94±0,11	7,15±0,11	6,79±0,49	5,63±0,12	6,12±0,12
60	4,62±0,36	4,89±0,04	4,95±0,67	5,33±0,07	4,84±0,21
90	4,47±0,32	4,45±0,34	4,27±0,23	4,46±0,16	4,74±0,26
120	4,37±0,40	4,38±0,15	4,26±0,11	4,33±0,13	4,44±0,29
Ort.	5,55A±0,45	5,62A±0,44	5,51A±0,45	5,41A±0,36	5,47A±0,35

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Çizelge 4.26 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in laktik aside karşı çapraz direnci (log kob/mL) gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,51A ^a ±0,24	7,12A ^a ±0,18	7,18A ^a ±0,00	7,04A ^a ±0,08	7,21A ^a ±0,03
30	7,06A ^a ±0,12	6,87A ^{ab} ±0,09	7,06A ^a ±0,09	6,28B ^{bc} ±0,24	6,12B ^c ±0,12
60	5,29B ^{ab} ±0,06	5,19B ^{ab} ±0,01	5,87B ^a ±0,21	4,95C ^b ±0,38	4,84C ^b ±0,21
90	4,96B ^{ab} ±0,08	4,99B ^{ab} ±0,09	5,32BC ^a ±0,14	4,41C ^b ±0,56	4,74C ^{ab} ±0,26
120	4,73B ^a ±0,15	4,61B ^a ±0,29	5,04C ^a ±0,19	3,15D ^b ±0,67	4,44C ^a ±0,29

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika
A, B, C (↓); a, b, c (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Asit adaptasyonu, yalnızca asit stresine değil diğer subletal streslere karşıda çapraz koruma sağlamaktadır. *L. monocytogenes*'in stres adaptasyon mekanizmasının, kuvvetli asit, sıcaklık, tuzluluk, kristal viyole, etanol, yüksek CO₂ (%25-30) ve H₂O₂ gibi farklı streslere karşı koruma sağladığı birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (Leyer vd.

1995, O'Driscoll vd. 1996, Lou ve Yousef 1997, Bolton ve Frank 1999, Phan-Thanh vd. 2000, Francis ve O'Beirne 2001, Koutsoumanis vd. 2003). Foley vd. (2005), asetik, laktik ve sitrik asit kullanarak aside adapte ettikleri *L. monocytogenes*'in gama radyasyona (0,59-0,72 kGy) olan dirençlerinin, kullanılan asit çeşidine bağlı olarak değişim gösterdiğini, radyasyona olan en yüksek direncin asetik asit adaptasyonu ile elde edildiğini belirtmişlerdir. Calicioglu vd. (2002) tarafından yürütülen çalışmada, asit adaptasyonunun *L. monocytogenes*'in kurutma prosesine olan direncini arttırmadığı rapor edilmiştir. Skandamis vd. (2008), HCl kullanılarak pH'sı 5,0'a ayarlanmış besiyerinde aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in, laktik aside olan çapraz direncinin arttığı ve direnç artışında suşlar arasındaki farklılığın önemli olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada ise HCl adaptasyonu laktik aside olan direnci arttırmamıştır.

4.5 *E. coli* O157:H7'nin HCl ile Aside Tolerans Kazandırılması

HCl kullanılarak pH'sı 4,5; 5,0 ve 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0 ve 3,5'teki canlılık düzeyleri tespit edilmiştir.

pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.27'de verilmiştir. İnkübasyonun 3. saatinde 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 1,31; 0,69; 0,07; 0,80 ve 1,79 log kob/mL azalmıştır. 6 saatlik inkübasyon sonunda ise deneme gruplarının tamamında bakteri sayısı 1,00 log kob/mL düzeyinin altına düşmüştür. İstatistik değerlendirme sonucunda, deneme gruplarının bakteri sayılarının ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

pH 5,0'da 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.28'de verilmiştir. pH 5,0'da farklı sürelerde aside tolerans kazandırılan deneme gruplarının pH 3,0'daki canlı kalma düzeyleri adaptasyon sürelerine bağlı olarak değişim göstermiştir. ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı, diğer deneme gruplarına kıyasla daha hızlı bir azalma eğilimi

göstermiştir. 6 saatlik inkübasyon sonunda, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubundaki bakteri sayısı sırasıyla 3,57; 3,27; 2,89; 2,96 log kob/mL azalmıştır. ATK⁻ deneme grubunda ise bakteri sayısı 1,00 log kob/mL düzeyinin altına inmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda ise bakteri sayısı tüm gruplarda 1,00 log kob/mL düzeyinin altına inmiştir.

Çizelge 4.27 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ Süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	6,92	6,99	6,97	6,91	6,91
3	5,61	6,30	6,90	6,11	5,12
Ort.	6,26A±0,44	6,64A± 0,29	6,93A±0,03	6,51A±0,35	6,02A± 0,53

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Çizelge 4.28 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ Süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	6,90A ^a ±0,02	6,94A ^a ±0,01	6,85A ^a ±0,05	6,83A ^a ±0,04	6,91A ^a ±0,02
3	5,99B ^b ±0,13	6,67A ^a ±0,06	6,78A ^a ±0,01	6,67A ^a ±0,01	5,12B ^c ±0,26
6	3,33C ^b ±0,15	3,67B ^a ±0,07	3,96B ^a ±0,02	3,87B ^a ±0,09	<1,00C ^c
24	<1,00D ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a
48	<1,00D ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon
A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Çizelge 4.28'de görüldüğü üzere, 1., 2., 3., 4. deneme grubu ve ATK⁻ deneme grubunda, inkübasyonun 0. saatinde bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. İnkübasyonun 3. ve 6. saatinde ATK⁻ deneme grubu ile aside adapte edilen deneme grupları arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,01). 2., 3. ve 4. deneme grupları arasındaki fark önemsiz olup, bu deneme grupları ile 1. deneme

grubundaki bakteri sayısı arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Sonuç olarak pH 5,0'da 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasıyla bakterinin aside olan toleransı artmış, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyonda sağlanan direnç düzeyleri arasında fark yokken, 1 saatlik adaptasyon uygulamasına göre daha etkili oldukları belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise deneme grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

Düşük pH'nın bakteri gelişimini engellediği bilinmektedir. Fakat son yıllarda birçok araştırmacı tarafından ılımlı asit koşullara muameleden sonra asit toleransının arttığı rapor edilmiştir. Cheng vd. (2003), HCl kullanılarak pH'sı 5,0'a ayarlanmış TSB besiyerinde 1, 2, 3, 4 ve 6 saat süreyle *E. coli* O157:H7'yi aside adapte etmişler ve pH 3,0; 4,0 ve 5,0'daki yaşama düzeylerini belirlemişlerdir. Asit toleransının, pH'ya, asit çeşidine ve suşa bağlı olarak değişim gösterdiği ve en yüksek asit toleransının 4 saatlik adaptasyon süresi sonunda gerçekleştiği rapor edilmiştir. Direnç artışın en belirgin olarak pH 3,0'da görüldüğü, bunu pH 4,0 ve pH 5,0'ın izlediği belirtilmiştir. Bu araştırmada elde edilen verilere göre ise, adaptasyon süresi arttıkça asit toleransının arttığı, en yüksek asit toleransının 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyonda meydana geldiği saptanmıştır.

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.29'da verilmiştir. 3 saatlik inkübasyon sonrasında bakteri sayısı, 1. deneme grubunda 1,75; 2. deneme grubunda 0,30; 3. deneme grubunda 0,23; 4. deneme grubunda 0,54 ve ATK^- deneme grubunda 1,79 log kob/mL azalmıştır. İnkübasyon süresi 6 saate çıktığında 2.; 3. ve 4. deneme grubunda bakteri sayısı sırasıyla 4,14; 2,89; 2,49 log kob/mL azalırken, 1. deneme grubu ile ATK^- deneme grubunda 1,00 log kob/mL düzeyinin altına düşmüştür. İnkübasyon süresi arttıkça *E. coli* O157:H7'nin aside toleransı artmaktadır.

pH 5,5'te aside adapte edilen ve edilmeyen deneme gruplarında inkübasyonun 0. saatindeki bakteri sayıları arasındaki farkın istatistik açıdan önemsiz olduğu anlaşılmıştır. İnkübasyonun 3. saatinde 2, 3 ve 4 saat adaptasyona tabi tutulan deneme grupları ile ATK^- deneme grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,01$).

İnkübasyonun 6. saatinde en yüksek asit direncinin 3 ve 4 saatlik adaptasyon sonunda gerçekleştiği tespit edilmiştir ($p<0,01$).

Çizelge 4.29 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ Süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,00A ^a ±0,04	6,96A ^a ±0,04	7,08A ^a ±0,04	7,05A ^a ±0,10	6,91A ^a ±0,02
3	5,25B ^b ±1,20	6,66A ^a ±0,00	6,85A ^a ±0,06	6,51A ^a ±0,43	5,12B ^b ±0,26
6	<1,00C ^c	2,82B ^b ±0,33	4,19B ^a ±0,04	4,56B ^a ±0,05	<1,00C ^c
24	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a
24	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00B ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($p>0,05$)

Mide sıvısı enterik patojenlere karşı ilk bariyeri oluşturmaktadır. Patojen bakteriler enfeksiyon oluşturabilmek için midenin asidik koşullarında (pH 1,5- 2,5) canlılığını sürdürmek zorundadır. *E. coli* O157:H7'nin enfektif dozu diğer patojenlere kıyasla oldukça düşüktür. Bakterinin enfektif dozunun düşük olması mide asitliğine ve bağırsaklarda karşılaştığı ucucu yağ asitlerine direnç gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu patojenin ılımlı asit koşullara kısa veya uzun süre maruz bırakılması ile ölümcül asit koşullara olan direncinin arttığı da bilinmektedir. Yuk ve Marshall (2004), pH'sı 5,0 ile 6,0 arasında olan asidik koşullara adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin pH'sı 1,5 olan yapay mide sıvısına olan direncinin arttığı tespit edilmiştir. Bu araştırma da, farklı koşullarda aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0 gibi kuvvetli asit koşullarda yaşama oranının arttığı saptanmıştır.

Dlamini ve Buys (2009) tarafından, %1 glukoz içeren TSB besiyerinde 18 saat aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 UT10 ve ATCC 25922 suşlarının, pH'sı 4,5 ve 2,5'e ayarlanmış BHI besiyerinde canlı kalma düzeyleri araştırılmıştır. Asit adaptasyonu ile pH 4,5 ve pH 2,5'e olan direncin arttığı ve direnç artışının suşlar arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca pH 2,5'te 4 saatlik adaptasyon sonunda *E. coli* O157:H7 tespit

edilemediği belirtilmiştir. Asit adapte *E. coli* O157:H7'nin pH 2,5'te yaşama düzeyi üzerinde yürütülen çalışmalarda elde edilen bulgular birbirinden farklılık göstermektedir. Sainz vd. (2005), pH 2,5'te 1 saatlik inkübasyondan sonra bakteri tespit edemediklerini, Jonge vd. (2003), durma fazı hücrelerinin pH 2,5'te 2 saat, logaritmik faz hücrelerinin ise yarım saat içinde canlılıklarını kaybettiğini, Gorden ve Small (1993), pH 2,5'te 2 saat canlı kalabildiğini, Benjamin ve Data (1995) ise en az 5 saat bakterinin canlılığını sürdürdüğünü rapor etmişlerdir. Asit adaptasyonunun *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkisinin belirlendiği bu çalışmada, adaptasyon pH'sı ve süresine bağlı olarak, *E. coli* O157:H7 suşunun pH 3,0'da 3 ile 6 saat arasında canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

Tosun ve Gönül (2005) tarafından yürütülen çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin durma fazı hücreleri pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle aside adapte edilmiş ve pH 3,0'a olan dirençleri belirlenmiştir. Araştırma sonunda en yüksek asit toleransının pH 4,5'te 2 saatlik adaptasyonda elde edildiği belirtilmiştir. Cheng ve Chou (2001), pH'sı 5,0 olan TSB besiyerinde 4 saatlik adaptasyondan sonra *E. coli* O157:H7'nin aside tolerans kazandığı ve farklı asidik gıdalardaki yaşama oranının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'da yaşama oranı üzerinde, pH 5,5'te 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulaması artışa neden olmuş, en yüksek artış 3 ve 4 saatlik adaptasyonda elde edilmiştir.

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.30'da verilmiştir. *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'da yaşama düzeyi üzerinde, pH 5,0'da 1 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyon, pH 4,5 ve pH 5,5'e kıyasla daha etkili olmuştur. pH 4,5; pH 5,0 ve 5,5'te tespit edilen bakteri sayılarının ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. pH 5,0 ve pH 5,5'te 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulaması aynı düzeyde direnç artışa neden olurken, bu artış pH 4,5'ten daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.30 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,0'daki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnkübasyon süresi (saat)					
pH	Deneme	0	3	6	Ort.
4,5	1	6,92	5,61	1,00	4,51±1,14
5,0		6,90	5,99	3,33	5,40±0,68
5,5		7,00	5,25	1,00	4,42±1,17
Ort.		6,94±0,02	5,61±0,37	1,78±0,49	
4,5	2	6,99 ^A ±0,06	6,30 ^A ±0,53	1,00 ^C ±0,00	4,76±1,20
5,0		6,94 ^A ±0,01	6,67 ^A ±0,06	3,67 ^B ±0,07	5,76±0,66
5,5		6,96 ^A ±0,04	6,66 ^A ±0,01	2,82 ^B ±0,33	5,48±0,85
Ort.		6,96±0,02	6,54±0,16	2,50±0,51	
4,5	3	6,97 ^B ±0,01	6,90 ^A ±0,05	1,00 ^B ±0,00	4,96±1,25
5,0		6,85 ^C ±0,05	6,78 ^B ±0,01	3,96 ^A ±0,02	5,86±0,60
5,5		7,08 ^A ±0,04	6,85 ^{AB} ±0,06	4,19 ^A ±0,00	6,04±1,26
Ort.		6,97±0,04	6,84±0,03	3,05±0,62	
4,5	4	6,91 ^A ±0,08	6,11 ^A ±0,63	1,00 ^B ±0,00	4,67±1,18
5,0		6,83 ^A ±0,04	6,67 ^A ±0,01	3,87 ^A ±0,09	5,79±0,61
5,5		7,05 ^A ±0,10	6,51 ^A ±0,43	4,56 ^A ±0,05	6,04±0,50
Ort.		6,93±0,05	6,43±0,22	3,14±0,69	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (İ) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.31'de verilmiştir. pH 4,5'te aside tolerans kazandırılmış *E. coli* O157:H7'nin adaptasyon süresine bağlı olarak canlılık düzeyinde farklılık olduğu görülmüştür. ATK⁻ deneme grubunda 24 saat sonunda bakteri sayısında 3,95 log kob/mL azalma tespit edilmiştir. 1.; 2.; 3. ve 4. deneme grubunda bakteri sayısı sırasıyla 3,31; 4,34; 2,86 ve 4,29 log

kob/mL azalmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda deneme gruplarındaki bakteri sayısı <1,00 log kob/mL düzeyine ulaşmıştır. Deneme gruplarındaki bakteri sayılarının ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz olup, pH 4,5'te gerçekleştirilen adaptasyon *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'te yaşama düzeyinde artışa neden olmamıştır.

Çizelge 4.31 pH 4,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,10	7,17	7,17	7,10	7,21
1	7,15	7,10	7,08	7,08	7,20
2	7,10	7,09	7,01	7,04	7,17
3	7,08	7,05	6,94	7,02	7,14
4	6,97	6,98	6,86	6,98	7,13
5	6,93	6,87	6,92	6,87	7,08
24	3,79	2,83	4,31	2,81	3,26
Ort.	6,58A±0,33	6,44A±0,41	6,61A±0,26	6,41A±0,42	6,60A±0,38

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,0'da 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.32'de verilmiştir. pH 5,0'da aside adaptasyon denemelerinde bakteri sayısı, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubunda sırasıyla 3,25; 3,58; 3,86; 4,51 ve 3,95 log kob/mL azalmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, 1. 2. ve 3. deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 4 saatlik asit adaptasyon uygulaması ise aside olan duyarlılığı arttırmıştır (p<0,05).

Çizelge 4.32 pH 5,0'da HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,14A ^a ±0,06	7,08A ^a ±0,04	7,10A ^a ±0,16	7,04A ^a ±0,05	7,21A ^a ±0,10
1	7,11A ^a ±0,07	7,06A ^a ±0,02	7,06A ^a ±0,13	7,02A ^a ±0,07	7,20A ^a ±0,09
2	7,02A ^a ±0,07	7,03A ^a ±0,05	7,02A ^a ±0,14	6,95A ^a ±0,04	7,17A ^a ±0,09
3	6,96A ^a ±0,04	6,96A ^a ±0,08	7,00A ^a ±0,15	6,96A ^a ±0,12	7,14A ^a ±0,06
4	6,95A ^a ±0,05	6,96A ^a ±0,09	6,95A ^a ±0,16	6,95A ^a ±0,13	7,13A ^a ±0,05
5	6,60A ^a ±0,40	6,93A ^a ±0,08	6,82A ^a ±0,07	6,88A ^a ±0,13	7,08A ^a ±0,04
24	3,89B ^a ±1,01	3,50B ^a ±0,32	3,24B ^a ±0,05	2,53B ^b ±0,38	3,26B ^a ±0,11
48	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle HCl'ye tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.33'te verilmiştir. pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılığı üzerine yürütülen denemelerde 48 saatlik inkübasyondan sonra bakteri sayısı, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubunda sırasıyla 4,84; 4,71; 4,69; 4,59 5,09 log kob/mL azalmıştır. ATK⁻ grupta ise bakteri sayısı 1,00 log kob/mL düzeyinin altına inmiştir. 5 saatlik inkübasyon süresince deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. 24. ve 48. saatlerde ise ATK⁻ deneme grubunda tespit edilen bakteri sayısı diğer deneme gruplarından daha düşüktür (p<0,05). 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon sonrasında *E. coli* O157:H7'nin aside direnç kazandığı belirlenmiş olup, adaptasyon süreleri arasında fark görülmemiştir.

Çizelge 4.33 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Saat)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,08A ^a ±0,04	7,03A ^a ±0,05	7,02A ^a ±0,02	7,04A ^a ±0,05	7,21A ^a ±0,10
1	6,93A ^a ±0,06	6,99A ^a ±0,06	6,97A ^a ±0,04	7,03A ^a ±0,05	7,20A ^a ±0,09
2	6,92A ^a ±0,05	6,93A ^a ±0,01	6,89A ^a ±0,11	6,95A ^a ±0,04	7,17A ^a ±0,09
3	6,92A ^a ±0,05	6,92A ^a ±0,02	6,87A ^a ±0,10	6,95A ^a ±0,05	7,14A ^a ±0,06
4	6,89A ^a ±0,04	6,83A ^a ±0,03	6,85A ^a ±0,10	6,92A ^a ±0,05	7,13A ^a ±0,05
5	6,83A ^a ±0,03	6,80A ^a ±0,01	6,79A ^a ±0,08	6,73A ^a ±0,13	7,08A ^a ±0,04
24	5,01B ^b ±0,47	5,46B ^b ±1,00	5,46B ^b ±1,00	6,41A ^a ±0,11	3,26B ^c ±0,11
48	2,24C ^b ±0,29	2,32C ^b ±0,72	2,33C ^b ±0,14	1,95B ^b ±0,10	<1,00C ^c

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon

A, B, C (↓); a, b, c (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerinin karşılaştırılması Çizelge 4.34'te verilmiştir. 1 saatlik asit adaptasyon uygulamasında, pH 4,5; 5,0 ve 5,5 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. pH 4,5 ve pH 5,0'da 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyon uygulamasının *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'te yaşama oranı üzerinde artışa neden olmadığı, pH 5,5'te 2, 3 ve 4 saat süreyle gerçekleştirilen adaptasyonun direnci arttırdığı tespit edilmiştir (p<0,01).

Koutsoumanis ve Sofos (2004), 4,0-6,0 arasındaki pH değerlerinde 90 dakika aside adapte ettikleri *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki yaşama düzeyini araştırmışlardır. pH 5,0'da gerçekleştirilen adaptasyonun en yüksek düzeyde artışa neden olduğu saptanmıştır. Yürüttüğümüz araştırmada, pH 3,5'te yaşama oranında en yüksek artış, pH 5,5'te gerçekleştirilen adaptasyonda elde edilmiştir.

Çizelge 4.34 pH 4,5; 5,0 ve 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnkübasyon süresi (saat)										
pH	Deneme	0	1	2	3	4	5	24	48	Ort.
4,5	1	7,10	7,15	7,10	7,08	6,97	6,93	3,79	1,00	5,89±0,56
5,0		7,14	7,11	7,02	6,96	6,95	6,60	3,89	1,00	5,83±0,55
5,5		7,08	6,93	6,92	6,92	6,89	6,83	5,01	2,24	6,10±0,41
Ort		7,10±0,03	7,06±0,05	7,01±0,04	6,98±0,05	6,93±0,04	6,78±0,13	4,23±0,43	1,41±0,27	
4,5	2	7,17 ^A ±0,06	7,10 ^A ±0,10	7,09 ^A ±0,09	7,05 ^A ±0,06	6,98 ^A ±0,07	6,87 ^A ±0,13	2,83 ^B ±0,43	1,00 ^B ±0,00	5,76±0,59
5,0		7,08 ^A ±0,04	7,06 ^A ±0,02	7,03 ^A ±0,05	6,96 ^A ±0,08	7,00 ^A ±0,09	6,93 ^A ±0,08	3,50 ^B ±0,32	1,00 ^B ±0,00	5,81±0,56
5,5		7,03 ^A ±0,05	6,99 ^A ±0,06	6,93 ^A ±0,01	6,92 ^A ±0,02	6,83 ^A ±0,03	6,80 ^A ±0,01	5,46 ^A ±1,00	2,32 ^A ±0,72	6,16±0,41
Ort		7,10±0,03	7,05±0,04	7,02±0,04	6,98±0,04	6,92±0,04	6,87±0,05	3,93±0,58	1,44±0,34	
4,5	3	7,17 ^A ±0,06	7,08 ^A ±0,10	7,01 ^A ±0,07	6,94 ^A ±0,04	6,86 ^A ±0,11	6,92 ^A ±0,08	4,31 ^B ±0,03	1,00 ^B ±0,00	5,91±0,53
5,0		7,10 ^A ±0,16	7,06 ^A ±0,13	7,02 ^A ±0,14	7,00 ^A ±0,15	7,00 ^A ±0,16	6,82 ^A ±0,07	3,24 ^B ±0,04	1,00 ^B ±0,00	5,78±0,67
5,5		7,02 ^A ±0,02	6,97 ^A ±0,04	6,89 ^A ±0,11	6,87 ^A ±0,10	6,85 ^A ±0,10	6,79 ^A ±0,08	5,46 ^A ±1,00	2,33 ^A ±1,01	6,15±0,21
Ort		7,10±0,05	7,03±0,05	6,97±0,06	6,94±0,05	6,90±0,06	6,84±0,04	4,34±0,88	1,44±0,94	
4,5	4	7,10 ^A ±0,15	7,08 ^A ±0,00	7,04 ^A ±0,00	7,02 ^A ±0,02	6,98 ^A ±0,06	6,87 ^A ±0,18	2,81 ^B ±0,66	1,00 ^B ±0,00	5,74±0,59
5,0		7,04 ^A ±0,05	7,02 ^A ±0,07	6,95 ^A ±0,04	6,96 ^A ±0,12	6,95 ^A ±0,13	6,88 ^A ±0,13	2,53 ^B ±0,38	1,00 ^B ±0,00	5,66±0,59
5,5		7,04 ^A ±0,05	7,03 ^A ±0,05	6,95 ^A ±0,04	6,95 ^A ±0,05	6,92 ^A ±0,05	6,73 ^A ±0,13	6,41 ^A ±0,11	1,95 ^A ±0,10	6,25±0,42
Ort		7,06±0,02	7,04±0,03	6,98±0,02	6,98±0,04	6,95±0,04	6,82±0,07	3,91±0,81	1,32±0,20	

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (↓) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

4.6 *E. coli* O157:H7'nin Organik Asitler ile Aside Tolerans Kazandırılması

HCl kullanılarak yürütülen adaptasyon denemelerinde *E. coli* O157:H7'de en yüksek direnç artışının pH 5,5'te gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu nedenden dolayı, organik asit adaptasyon denemeleri, asetik, laktik ve sitrik asit kullanılarak pH'sı 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde yapılmıştır.

Asetik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.35'te verilmiştir. Bakteri sayısı 1., 2., 3. ve 4. deneme grubunda sırasıyla 0,53; 0,54; 0,36 ve 0,90 log kob/mL, ATK⁻ deneme grubunda ise 3,09 log kob/mL azalmıştır.

Çizelge 4.35 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	6,99A ^a ±0,01	6,95A ^a ±0,10	7,02A ^a ±0,02	7,15A ^a ±0,00	7,00A ^a ±0,00
30	6,46B ^{ab} ±0,23	6,41B ^b ±0,03	6,66B ^a ±0,07	6,25B ^b ±0,02	3,91B ^c ±0,03
60	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a
90	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a
120	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a	<1,00C ^a

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk. Dakika

A, B, C (↓); a, b, c (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle asetik aside adapte edilen deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunda inkübasyonun 0. dakikasında, bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. 30. dakikada aside adapte edilen deneme gruplarının tümündeki bakteri sayıları ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı arasındaki fark istatistik açıdan önemlidir (p<0,01). En yüksek asit direnci 3 saatlik adaptasyon işleminde gerçekleşmiştir (p<0,01).

Laktik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.36'da verilmiştir. 1. deneme grubu ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı 120. dakikada 1,00 log kob/mL'nin altına inmiştir. 2., 3. ve 4. deneme grubundaki bakteri sayısı ise sırasıyla 3,84; 2,39; 2,72 log kob/mL azalmıştır.

pH 5,5'te 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle laktik aside adapte edilen deneme grupları ile ATK⁻ deneme grubunda inkübasyonun 0. ve 30. dakikasında bakteri sayıları arasındaki farkın istatistik açıdan önemsiz olduğu görülmüştür. 60. ve 90. dakikada 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyona tabi tutulan deneme gruplarındaki bakteri sayıları ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayıları arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,01). 120 dakikalık inkübasyon sonrasında en yüksek asit direnci 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasına tabi tutulan deneme gruplarında tespit edilmiştir (p<0,01).

Çizelge 4.36 pH 5,5'te laktik aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,01A ^a ±0,03	7,03A ^a ±0,05	7,04A ^a ±0,11	7,06A ^a ±0,06	7,08A ^a ±0,08
30	6,93A ^a ±0,07	6,97A ^a ±0,00	6,94A ^a ±0,03	6,94A ^a ±0,04	6,89A ^a ±0,10
60	5,39B ^b ±0,25	6,38A ^a ±0,12	6,68A ^a ±0,23	6,80A ^a ±0,06	5,31B ^b ±0,77
90	4,17C ^b ±0,25	5,30B ^a ±0,33	5,84B ^a ±0,39	5,81B ^a ±0,04	2,74C ^c ±0,26
120	<1,00D ^c	3,19C ^b ±0,33	4,65C ^a ±0,54	4,34C ^a ±0,04	<1,00D ^c

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,01)

Sitrik asit kullanılarak pH 5,5'te aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlılık düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.37'de verilmiştir. pH 5,5'te sitrik aside adaptasyon denemelerinde bakteri sayısı, 1. deneme grubunda 0,17; 2. deneme grubunda 0,12; 3. deneme grubunda 0,20; 4. deneme grubunda 0,17 log kob/mL ve ATK⁻ deneme grubunda 0,24 log kob/mL azalmıştır.

Sitrik asit kullanılarak gerçekleştirilen adaptasyon denemelerinde, deneme gruplarının ortalamaları arasındaki farkın istatistik açıdan önemsiz olduğu, sitrik asit uygulamasının direnç artışına neden olmadığı tespit edilmiştir.

E. coli O157:H7'de organik asitler kullanılarak yürütülen adaptasyon denemelerinde, sitrik asit adaptasyonu ile bakterinin sitrik aside olan direncinde artış meydana gelmediği belirlenmiştir. Asetik asit kullanılarak yürütülen adaptasyon denemelerinde, 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasının *E. coli* O157:H7'nin asetik aside olan direncini arttırdığı, en yüksek direncin 3 saatlik adaptasyon sırasında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Laktik asit kullanılarak yürütülen denemelerde, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon uygulamasının *E. coli* O157:H7'nin laktik aside olan direncini arttırdığı, en yüksek direncin ise 3 ve 4 saatlik adaptasyonda gerçekleştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.37 pH 5,5'te sitrik aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin pH 3,5'teki canlı kalma düzeyini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	7,06	7,08	7,06	7,08	7,10
30	7,00	7,06	7,04	7,06	7,04
60	6,96	7,02	6,96	7,00	7,01
90	6,94	6,99	6,95	6,99	6,97
120	6,89	6,96	6,86	6,91	6,86
Ort	6,97A±0,02	7,02A±0,01	6,97A±0,03	7,00A±0,02	6,99A±0,03

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk: Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Ryu ve Beuchat (1998) tarafından, *E. coli* O157:H7'nin, asit şok, asit adapte ve kontrol hücrelerinin laktik asit ve asetik asit ile asitlendirilmiş TSB besiyerindeki gelişme özellikleri incelenmiştir. Asetik asit denemelerinde (pH 3,4), bu üç hücre tipi aynı davranışı sergilemiştir. Laktik asit denemelerinde (pH 3,9), asit adapte ve asit şok hücrelerinin sayısının kontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu, asit adapte hücrelerin asidik koşulları asit şok hücrelerine kıyasla daha iyi tolere edebildiği saptanmıştır. Asit tolerans yanıtının, asit çeşidi, pH ve hücre tipine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu araştırmada, tolerans yanıtının kullanılan asit çeşidine bağlı olarak değişim gösterdiği ortaya konulmuştur. *E. coli* O157:H7'nin, asetik ve laktik aside toleransı artarken, sitrik aside olan toleransında artış elde edilememiştir.

Leyer vd. (1995), *E. coli* O157:H7, 1-2 generasyon zamanı süresince pH 5,0'da geliştirilerek aside adapte edilmiştir. Asit adapte hücrelerin laktik asitle pH'sı 3,85'e ayarlanmış ortama olan dirençlerinin arttığı, direnç düzeylerinin türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Laktik aside yönelik yürüttüğümüz deneme sonuçlarına göre, pH 5,5'te 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyonun *E. coli* O157:H7'nin laktik aside olan direncini arttırdığı anlaşılmıştır. .

Goodson ve Rowbury (1989) tarafından, pH 5,0'da aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin, laktik, benzoik, propiyonik, sorbik ve asetik asit içeren pH'sı 3,5 olan besiyerinde canlı kalma süresinin arttığı belirlenmiştir

Gıda patojenlerine karşı organik asitlerin inorganik asitlerden daha etkili olduğu ve bu etkinin hücre içine diffuz yeteneklerinin yüksek olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Deng vd. 1999, Phan-Thanh vd. 2000, Buchanan vd. 2004, Breidt vd. 2004).

Buchanan ve Edelson (1999), *E. coli* O157:H7 üzerinde, HCl, asetik, laktik, malik ve sitrik asidin inhibitör etkisini araştırmışlardır. En yüksek inhibitör etkinin laktik asitte, en az inhibitör etkinin HCl'de elde edildiği, asetik, sitrik ve malik aside olan duyarlılığın ise suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Deng vd. (1999), %1,25 glukoz içeren TSB besiyerinde 18 saat geliştirilerek aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 üzerinde organik asitlerin inhibitör etkisinin asetik>laktik>malik asit şeklinde olduğu gösterilmiştir. Ryu vd. (1999) tarafından farklı asitlerin *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, bakteriyostatik etkinin asetik asit>laktik asit>sitrik asit şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada ise, asetik, laktik ve sitrik asit, HCl'ye oranla daha etkili bulunmuş, organik asitlerin bakterisidal etkisinin asetik>laktik>sitrik asit şeklinde olduğu belirlenmiştir.

4.7 *E. coli* O157:H7'nin Laktik Aside Karşı Çapraz Direncinin Belirlenmesi

Bölüm 4.5 ve 4.6'da belirtildiği üzere farklı organik ve inorganik asitler kullanılarak *E. coli* O157:H7 aside tolerans kazandırılmıştır. HCl, asetik ve laktik asit kullanımıyla *E. coli* O157:H7'nin aside direnç kazandığı, sitrik asit kullanımının direnç artışına neden olmadığı belirlenmiştir. Laktik aside olan çapraz direncin belirlenmesi aşamasında, direnç artışı sağlanan HCl ve asetik asit üzerinde denemelere devam edilmiştir.

pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış TSB besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.38'de verilmiştir. Laktik aside olan çapraz direncin

belirlenmesi sırasında bakteri sayısı, 1., 2., 3. ve 4. deneme grubunda sırasıyla 5,08; 4,40; 3,57; 3,48 log kob/mL azalmıştır. ATK⁻ deneme grubunda ise 120 dakika sonunda bakteri sayısı 1,00 log kob/mL'in altına düşmüştür. 3. ve 4. deneme grubunun bakteri sayısındaki azalma diğer gruplara kıyasla daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 4.38 pH 5,5'te asetik aside tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin laktik aside karşı çapraz direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				
	ATK ⁺ süresi (saat)				ATK ⁻
	1	2	3	4	
0	6,94A ^a ±0,11	6,96A ^a ±0,05	7,04A ^a ±0,04	6,99A ^a ±0,02	7,08A ^a ±0,08
30	6,74AB ^a ±0,01	6,88A ^a ±0,04	6,85A ^a ±0,02	6,90A ^a ±0,02	6,89A ^a ±0,10
60	5,94B ^a ±0,32	6,72A ^a ±0,06	6,82A ^a ±0,03	6,61A ^a ±0,23	5,31B ^b ±0,77
90	4,36C ^b ±0,32	5,58B ^a ±0,01	5,43B ^{ab} ±0,54	4,55B ^{ab} ±0,60	2,74C ^c ±0,26
120	1,86D ^b ±0,33	2,56C ^{ab} ±0,56	3,47C ^a ±0,99	3,51C ^a ±0,60	<1,00D ^c

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk: Dakika

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (↔) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

İnkübasyonun 0. ve 30. dakikasında deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. 60. 90. ve 120. dakikada 1, 2, 3 ve 4 saat adaptasyona tabi tutulan deneme gruplarındaki bakteri sayıları ile ATK⁻ deneme grubundaki bakteri sayısı arasındaki fark istatistik açıdan önemlidir (p<0,05). 120 dakikalık inkübasyon sonrasında 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyona tabi tutulan deneme grupları arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak 1, 2, 3 ve 4 saatlik adaptasyon işlemi bakterinin laktik aside olan çapraz direncini arttırmış, en yüksek direnç 3 ve 4 saatlik adaptasyonda gerçekleşmiştir (p<0,05).

Bakterinin karşılaştığı strese adapte olurken aynı anda diğer streslere de adapte olarak direnç kazanabileceği birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Arnold and Kaspar 1995, Cheville vd. 1996, Tosun ve Gönül 2003). Bu araştırmada, asetik aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin laktik aside olan direncinin arttığı tespit edilmiştir. Aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 diğer organik asitlere de direnç kazanabileceği saptanmıştır.

pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin laktik asit kullanılarak pH'sı 3,5'e ayarlanmış TSB besiyerindeki canlılığı üzerine yürütülen denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.39'da verilmiştir. 90 dakikalık inkübasyon sonunda bakteri sayısı, 1., 2., 3., 4. ve ATK⁻ deneme grubunda sırasıyla, 4,51; 2,48; 2,57; 4,24 ve 4,34 log kob/mL azalmıştır. İstatistik değerlendirme sonucunda, deneme gruplarının ortalamaları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. HCl adaptasyonu laktik aside olan çapraz direnci arttırmamıştır.

Çizelge 4.39 pH 5,5'te HCl'ye tolerans kazandırılan *E. coli* O157:H7'nin laktik aside karşı çapraz direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

İnk. (Dk)	DENEME GRUPLARI				ATK ⁻
	ATK ⁺ süresi (saat)				
	1	2	3	4	
0	7,03	6,91	7,02	7,19	7,08
30	6,52	6,87	6,84	6,98	6,89
60	5,80	6,28	6,44	6,46	5,31
90	2,52	4,43	4,45	2,95	2,74
Ort.	5,47A±0,69	6,12A±0,42	6,19A±0,43	5,90A±0,66	5,50A±0,67

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. İnk: İnkübasyon; Dk: Dakika; Ort: Ortalama
A, B, C (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Cheng vd. (2003), pH 5,0'da (HCl) 4 saat aside adapte edilen *E. coli* O157:H7'nin, asetik ve laktik aside olan çapraz direnci araştırılmıştır. Asetik asit varlığında, ATK⁺ ve ATK⁻ bakteri sayısının sırasıyla 0,36 ve 1,00 log kob/mL, laktik asit varlığında 1,70 ve 3,47 log kob/mL düzeyinde azaldığı belirlenmiştir. HCl adaptasyonu ile organik asitlere olan direncin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise HCl adaptasyonu laktik aside olan direnci arttırmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlarla bu konuda yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde, *E. coli* O157:H7'nin farklı yöntemler kullanılarak aside tolerans kazanabileceği gerçeği ortaya koyulmuştur.

4.8 *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin Tuz Toleransının Belirlenmesi

Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde tuza tolerans kazandırılan (deneme) ve kazandırılmayan (kontrol) *L. monocytogenes* suşu, %8 NaCl içeren phosphate- buffer tamponuna inoküle edildikten sonra 4 °C ve 25 °C'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun belirli günlerinde tespit edilen sayım sonuçları Çizelge 4.40'da gösterilmiştir. Tuza (%3,5 NaCl) tolerans kazandırılan *L. monocytogenes*'in, 4 ve 25 °C'da inkübasyonu sırasında %8 NaCl içeren phosphate-buffer tamponunda tuza olan direncinin artmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.40 Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *L. monocytogenes*'in %8 NaCl'deki direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

25 °C			4 °C		
Gün	Deneme	Kontrol	Gün	Deneme	Kontrol
0	8,35	8,49	0	8,39A ^a ±0,09	8,46A ^a ±0,01
1	8,25	8,36	1	8,27B ^a ±0,04	8,43A ^a ±0,00
3	8,00	7,71	3	8,21B ^a ±0,06	8,36B ^a ±0,02
5	7,25	6,90	5	8,14C ^b ±0,09	8,32BC ^a ±0,02
10	5,71	6,16	10	8,06D ^b ±0,06	8,28C ^a ±0,02
15	5,45	5,71	15	8,03D ^b ±0,06	8,21D ^a ±0,06
20	5,33	5,70	20	7,95E ^b ±0,06	8,16DE ^a ±0,05
25	5,08	5,41	25	7,85F ^b ±0,05	8,10E ^a ±0,06
Ort.	6,67A±0,35	6,80A±0,31	Ort.	8,11A±0,05	8,29A±0,03

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Çizelge 4.40'da görüldüğü üzere, 4 °C'da inkübasyonun 5. gününden itibaren deneme grubundaki bakteri sayısı kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalmıştır. Tuz adaptasyon uygulaması, 4 °C'da inkübe elden *L. monocytogenes*'in tuz direncinde azalmaya neden olmuştur (p<0,05).

25 °C'da inkübasyon sırasında, inkübasyon süresi arttıkça bakteri sayısı azalmaktadır. İstatistik değerlendirme sonucunda, deneme grubu ile kontrol grubundaki bakteri sayılarının ortalamaları arasında farkın önemli olmadığı, *L. monocytogenes*'in tuz direncinin artmadığı tespit edilmiştir.

Vasseur vd. (1999) tarafından, *L. monocytogenes*'in pH 5,0-8,0'da, 25 °C'da ve %10 NaCl içeren Nutrient Broth'ta gelişebildiği belirtilmiş olup, NaCl bulunan ortamda gelişimin pH ve sıcaklığa bağlı olduğu ifade edilmiştir. NaCl miktarına bağlı olarak ozmotik basınç artmakta, lag faz uzamakta ve gelişme oranı azalmaktadır. Farber vd. (1992), *L. monocytogenes*'in optimum gelişiminin 15 °C'da 80 g/L NaCl varlığında gerçekleştiğini saptamışlardır. Faleiro vd. (2003), *L. monocytogenes*'in %25,5 NaCl içeren TSB besiyerinde 37 °C'da 4 gün, 22 °C'da 24 gün ve 4 °C'da 132 günden daha uzun süre canlılığını sürdürdüğü rapor edilmiştir. Bu araştırmada, *L. monocytogenes*'in, 25 °C'da %8 NaCl içeren ortamda 25 günden daha uzun süre canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir.

Tuz stresini tolere etmek için *L. monocytogenes* tarafından kullanılan mekanizmalardan biri, bazı proteinlerin sentezinin artmasına veya azalmasına neden olan genlerin ekspresyonunun değişimidir. *L. monocytogenes*'te tuz stresi sırasında 12 proteinin indüklendiği tespit edilmiştir (Duche vd. 2002, Kazmierczak vd. 2003, Gandhi ve Chikindas 2007). İzotonik koşullarda (5 g/L NaCl), *L. monocytogenes* tarafından sentezlenen proteinlerden büyük çoğunluğu, bakterinin 35-65 g/L NaCl'ye 1 saat maruz bırakılması sonucunda baskılanmaktadır. 35 g/L NaCl konsantrasyonda bu proteinlerden 5'i baskılanırken, 65 g/L NaCl konsantrasyonunda 21'i baskılanmış ve 11'i tamamen kaybolmuştur (Esvan vd. 2000). Ko vd. (1994), *L. monocytogenes*'in ozmotik stres altında gelişimi sırasında hücre içindeki glisin betainin artması sonucu tuza olan toleransının arttığı belirtilmiştir.

Faleiro vd. (2003), farklı kaynaklardan izole ettikleri *L. monocytogenes* suşlarını, %3,5 NaCl içeren besiyerinde 2 saat inkübe ederek tuza tolerans kazandırmış ve %20 NaCl içeren ortamdaki yaşama düzeyleri tespit edilmiştir. Tuz toleransının suşlar arasında farklılık gösterdiği 9 suştan 2'sinin tuz direncinde artış olmadığı ifade edilmiştir. Bu

araştırmada, tuz adaptasyonu ile *L. monocytogenes*'in tuza olan direncinin artmadığı belirlenmiştir.

Gutierrez vd. (1995), *L. monocytogenes*'in osmotik strese adaptasyonu, betain ve amino asit biriktirme yeteneğine bağlıdır. Hücreler yüksek tuz konsantrasyonunda (%4 NaCl), tuzsuz ortamdan 200 kat, 7 °C'da, 30 °C'dan 15 kat daha hızlı betain transport etmektedir. Bakterinin tuza olan direnci, düşük sıcaklıkta daha yüksektir. Tuz adaptasyonuna yönelik yürütülen bu araştırmada, *L. monocytogenes*'in tuza olan direncinin 4°C'da, 25 °C'tan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin 4 °C ve 25 °C'daki canlı kalma düzeylerini gösteren sayım sonuçları Çizelge 4.41'de verilmiştir. 4 °C'da 25 günlük inkübasyon sonrasında deneme grubu ve kontrol grubunun ortalamaları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. Tuza tolerans kazandırma *E. coli* O157:H7'nin, 4 °C'da inkübasyon sırasında tuza olan direncini arttırmamıştır.

Çizelge 4.41 Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin %8 NaCl'deki direncini gösteren sayım sonuçları (log kob/mL)* ve standart sapmaları

25 °C			4 °C		
Gün	Deneme	Kontrol	Gün	Deneme	Kontrol
0	8,05A ^a ±0,07	8,24A ^a ±0,16	0	8,04	8,18
1	7,52AB ^a ±0,12	7,95A ^a ±0,17	1	7,95	7,94
3	6,94BC ^a ±0,07	7,51A ^a ±0,10	3	7,96	7,94
5	6,62CD ^a ±0,19	7,44A ^a ±0,16	5	7,77	7,9
10	6,02DE ^a ±0,70	5,83B ^a ±0,68	10	7,59	7,81
15	5,27EF ^a ±0,19	4,30C ^a ±0,69	15	7,55	7,77
20	5,16EF ^a ±0,12	3,61C ^b ±0,25	20	7,39	7,68
25	4,93F ^a ±0,12	3,26C ^b ±0,26	25	7,15	7,43
			Ort.	7,67 ^a ±0,08	7,83 ^a ±0,06

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır. Ort: Ortalama

A, B, C (↓); ^{a, b, c} (→) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (p>0,05)

Tuza tolerans kazandırılan deneme grubu ve kontrol grubunun 25 °C'da inkübasyonunun 0, 1, 3, 5, 10 ve 15. günlerinde deneme gruplarındaki bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsizdir. 20. ve 25. günlerde deneme grubu ile kontrol grubunun bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). *E. coli* O157:H7'nin tuza tolerans kazandırılması ile tuza olan direncinin arttığı belirlenmiştir.

Koutsoumanis vd. (2003), ozmotik stres, düşük ve yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan *L. monocytogenes*'in asit stresine olan direncinin artmadığı rapor edilmiştir. Gıda üretimi sırasında bakterilerin stres koşullarına adaptasyon yeteneklerinin, üretim sırasındaki sıcaklık, pH ve tuz gibi stres faktörlerinin sayısına ve gelişme koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir. *L. monocytogenes*'in % 10,5 NaCl varlığında pH 5,5'e, maruz bırakılmasının, bakterinin asit direncinde azalmaya neden olduğu, fakat direnç azalmasının kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeyde kaldığı belirtilmiştir. Bolton ve Frank (1999). yüksek ozmotik koşullara adaptasyon *L. monocytogenes*'in termotoleransını artırmaktadır.

Arnold ve Kaspar (1995) tarafından, *E. coli* O157:H7'nin asit toleransının belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, 4 °C'da asit toleransının oluşmadığı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar tarafından, 8 °C'ın altındaki sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7'yi çevresel streslere karşı koruyan proteinlerin sentezlenmediği ifade edilmiştir. Tarafımızca yapılan bu çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin 25 °C'da muhafaza edilen grupta tuz direncinin artmasına rağmen, 4 °C'da muhafaza edilen grupta direnç artışının olmadığı belirlenmiştir. Bunun, Arnold ve Kaspar (1995) tarafından da belirtildiği gibi tuz toleransını sağlayacak proteinlerin sentezlenmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Glass vd. (1992) tarafından, *E. coli* O157:H7'nin yaşama oranı üzerinde asit ve NaCl'nin etkisi araştırılmıştır. %6,5 gibi yüksek NaCl konsantrasyonunda *E. coli* O157:H7'nin gelişebildiğini belirlemişlerdir. Fakat %6,5 NaCl varlığında lag fazın normalden daha uzun olduğu bunun tuz tolerant popülasyonunun seçimi için önemli olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin %8 NaCl varlığında 25 günden daha uzun süre canlılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.

4.9 Aside Adapte Edilmiş *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in Türk Sucuğunda Yaşama Düzeylerinin Belirlenmesi

4.9.1 Olgunlaştırma ve depolama süresince *E. coli* O157:H7'nin canlı kalma oranındaki değişim

Laktik asit kullanılarak pH'sı 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 3 saatlik inkübasyon sonrasında aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 sucuk hamuruna ilave edilmiştir.

ATK⁺ ve ATK⁻ *E. coli* O157:H7 ilave edilen fermente Türk sucuklarında, olgunlaştırma ve depolama periyodu süresince belirlenen laktik asit bakterileri (LAB), *Staphylococcus* spp., sayım sonuçları ile pH ve % nem düzeyleri Çizelge 4.42'de verilmiştir. Deneme grubunun sucuk hamuruna 5,80 log kob/g düzeyinde ilave edilen ATK⁺ *E. coli* O157:H7 sayısı, sucuk hamurunun bir gece 4 °C'da bekletilmesi sonucunda 0,43 log kob/g düzeyinde azalmıştır. Kontrol grubunun sucuk hamuruna 5,53 log kob/g düzeyinde ilave edilen ATK⁻ *E. coli* O157:H7 sayısı ise 0,89 log kob/g düzeyinde azalma göstermiştir. Olgunlaşmanın başlangıcından itibaren ATK⁺ ve ATK⁻ *E. coli* O157:H7 sayısı azalmaya başlamış olup, 4. günden itibaren daha hızlı bir azalma eğilimi göstermiştir. 6. günün sonunda *E. coli* O157:H7 sayısı ATK⁺ grupta 3,11 log kob/g; ATK⁻ grupta ise 2,30 log kob/g düzeyine inmiştir. Bakteri sayısı ATK⁺ grupta 30. günde, ATK⁻ grupta ise 8. günde <2,00 log kob/g düzeyinin altına inmiştir. Asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama oranı artmış, aside adapte edilmemiş *E. coli* O157:H7'ye kıyasla 22 gün daha fazla canlılığını sürdürmüştür. Deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur (p<0,01).

Çizelge 4.42 Olgunlaştırma (Fermantasyon + Kurutma) ve depolama döneminde *E. coli* O157:H7 sayısı, LAB sayısı, *Staphylococcus* sayısı, pH ve % nem miktarı

Deneme (ATK ⁺)						Kontrol (ATK ⁻)				
Gün	<i>E. coli</i> O157:H7	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem	<i>E. coli</i> O157:H7	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem
Hamur										
Bekletme	5,80	6,48	6,43	5,78	59,19	5,53	6,45	6,33	5,75	59,22
Olgunlaştırma										
0	5,37	6,65	6,39	5,80	57,15	4,64	6,52	6,29	5,75	58,62
1	4,82	9,25	6,69	4,65	56,11	4,37	9,14	6,17	4,62	58,51
2	4,31	9,42	6,09	4,42	54,35	3,89	9,31	6,28	4,39	54,00
3	4,15	9,35	6,16	4,56	50,21	3,68	9,36	6,12	4,59	50,47
4	4,03	9,19	6,09	4,54	48,20	3,51	9,20	5,98	4,52	49,19
6	3,11	9,21	6,69	4,48	43,01	2,30	9,32	6,08	4,44	38,49
Depolama										
8	2,72	9,22	6,90	4,61	39,82	<2,00	9,12	7,15	4,59	35,88
15	2,50	8,75	6,21	4,74	35,37	<2,00	8,79	7,24	4,60	31,04
30	<2,00	8,83	5,75	4,76	34,39	<2,00	8,57	6,15	4,72	30,06

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır

Uyttendaele vd. (2001), *E. coli* O157:H7'nin fermente sucuklarda (pH 4,5, %5 NaCl) 7 °C'da 35 gün, Glass vd. (1992) tarafından da, pH'sı 4,4 olan ve %3,5 NaCl içeren fermente sucuklarda 4°C'da 8 hafta canlılığını sürdürebildiği belirtilmiştir.

Öz vd. (2002), sucuk hamuruna ilave edilen *E. coli* O157:H7 sayısının 3. günde 0,50; 7. günde 1,00; 14. günde 2,50; 21. günde 4,00 logaritmik birim azaldığını belirlemişlerdir. Coşansu ve Ayhan (2000), *E. coli* O157:H7 sayısının, fermentasyon ve kurutma periyotları boyunca (8. günde) 3,00 logaritmik birim azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada ise *E. coli* O157:H7 sayısı 3. günde 1,85; 6. günde 3,23; 15. günde <2,64 logaritmik birim azalmıştır. Kurutma periyodunun sonunda, *E. coli* O157:H7 sayısı, deneme grubunda 3,08; kontrol grubunda 3,53 log kob/g azalmıştır. Yapılan araştırmalar, olgunlaştırma periyodunun *E. coli* O157:H7'nin sayısının azalmasında önemli bir faktör olduğunu göstermiştir.

Calicioğlu vd. (2001), starter kültür kullanılarak hazırlanan sucuklarda, 24 °C'da 3 günlük fermentasyon (pH 4,6) ve kurutma (%40 nem) aşamasından sonra *E. coli* O157:H7 sayısının 2,0 log kob/g azaldığını belirtmiştir. Yürütülen bu araştırmada ise *E. coli* O157:H7 sayısı, kurutma periyodunun sonunda 3,53 log kob/g azalmıştır.

Glass vd. (1992), fermente kuru sucukta *E. coli* O157:H7'nin davranışı üzerine pH ve NaCl'nin etkileri araştırılmıştır. Sucuk hamuruna $4,8 \times 10^4$ kob/g düzeyinde *E. coli* O157:H7 ilave edilmiş ve pH 4,8'e düşünceye kadar fermente edilmiştir. Kurutulduktan sonra vakum paketlenme yapılarak 4 °C'da iki ay depolanmıştır. Bakterinin fermentasyon, kurutma ve depolama süresince gelişemediği, canlılığını sürdürdüğü ve depolama sonunda 2 logaritmik birim azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada fermentasyon başlangıcından itibaren *E. coli* O157:H7 sayısı azalmış ve 8. günde 2,00 log kob/g düzeyinin altına düşmüştür.

Leyer vd. (1995), pH 5,0'da aside tolerans kazandırdığı *E. coli* O157:H7'nin canlı kalma süresini, fermente bir et ürünü ve dilimlenmiş salamda tespit etmişlerdir. Ürünün fermentasyonu sonunda (pH 4,4) kontrol kültürü $2,2 \times 10^4$ kob/g düzeyinden $1,2 \times 10^2$ kob/g düzeyine düşerken, aside tolerans kazandırılan kültür $2,3 \times 10^4$ kob/g düzeyinden

5,0x10³ kob/g düzeyine düşmüştür. 5 °C'da depolanmış dilimlenmiş salamda ise (pH 5,0) 100 saat sonra aside tolerans kazandırılan kültür 1,2x10³ kob/g düzeyinde, kontrol kültürü ise 1,6x10² düzeyinde canlı kalmıştır. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada, fermantasyonun 1. gününde (pH 4,65) aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 sayısı sırasıyla 0,98 ve 1,16 log kob/g azalmıştır. Fermantasyon döneminde pH düşüşüne bağlı olarak bakteri sayısı azalmaktadır. Fakat aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 sayısındaki azalma aside adapte edilmeyen *E. coli* O157:H7'ye kıyasla daha düşüktür. Araştırma sonuçları, asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7'nin fermente et ürünlerinde yaşama oranının arttığına işaret etmektedir.

Riordan vd. (2000), aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7'nin, fermente bir et ürünü olan pepperoni'deki yaşama düzeyini araştırmışlardır. Fermantasyon süresince, asit adapte *E. coli* O157:H7 sayısının 0,95 log kob/g azaldığı, kontrol grubundaki *E. coli* O157:H7 sayısının ise 0,42 log kob/g azaldığı belirtilmiş olup, asit adaptasyonunun fermantasyon aşamasında bakterinin canlı kalma düzeyinde artışa neden olmadığı belirtilmiştir. Riordan vd. (2000)'nin aksine, bu araştırmada elde edilen veriler, asit adaptasyonunun *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama oranını arttırdığını göstermiştir.

E. coli O157:H7'nin asit adaptasyonu üzerinde, soğuk depolama ve depolama süresinin etkili olduğu bilinmektedir (Cheng ve Kaspar 1998). Lin vd. (1996), buzdolabında depolanan asit adapte *E. coli* O157:H7 hücrelerinin, asit toleransının 28 gün boyunca korunduğunu belirtmişlerdir.

Asetik ve laktik asit solüsyonları, sığır karkaslarındaki mikrobiyel yükün azaltılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Stopforth vd. (2007), sığır etlerine inoküle edilen asit adapte *E. coli* O157:H7'nin laktik asit uygulamasına karşı adapte edilmeyen hücrelere kıyasla daha dirençli hale geldiğini belirlemişlerdir. Berry ve Cutter (2000), aside adapte edilen ve edilmeyen *E. coli* O157:H7 ile inoküle edilmiş sığır karkasların, %2'lik asetik asit solüsyonu ile püskürtme yıkama yapılmasından sonra, karkas dokularında kalan asit adapte hücre popülasyonunun, adapte edilmeyen hücre popülasyonundan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu farklılığın 4 °C'da 14

günlük depolama boyunca devam ettiği bildirilmiştir. Fermente Türk sucuğu üzerinde yürütülen bu araştırmada, olgunlaştırma ve kurutma aşamalarının tamamlandığı 8. günden sonra sucuklar 4 °C'da depolanmıştır. Fermantasyonun 1. gününden itibaren aside adapte edilen *E. coli* O157:H7 sayısı, adapte edilmeyen hücre sayısından daha yüksektir. Hücre sayıları arasındaki bu farklılık 4 °C'da 24 günlük depolama boyunca devam etmiştir. Aside direnç sistemlerin soğukta depolama boyunca etkinliğini devam ettirdiği anlaşılmıştır.

Asit adaptasyonu ile *E. coli* O157:H7'nin, fermente et ve süt ürünleri, elma şarabı, portakal suyu, mango suyu, kuşkonmaz suyu, limon suyu, yoğurt, mayonez, ketçap, hardal ve salata sosu gibi asidik gıdalarda yaşama oranının arttığı tespit edilmiştir (Glass vd. 1992, Leyer vd. 1995, Cheng ve Chou 2001, Rhee 2003, Tosun ve Gönül 2003, Erdoğan ve Erbilir 2005, Samelis vd. 2005, Stopforth vd. 2007, Dlamini ve Buys (2008). Ryu ve Beuchat (1998) tarafından yürütülen çalışmada ise, asit adaptasyonunun *E. coli* O157:H7'nin elma ve portakal suyunda yaşama düzeyini arttırmadığı, fakat bakteri sayısının 5 °C'da depolanan örneklerde, 25 °C'da depolanan örneklerle kıyasla daha yüksek sayıda canlı kaldığı ve canlılığın 42 gün boyunca sürdüğü tespit edilmiştir. Stopforth vd. (2004) tarafından da, asit adaptasyonu ile, *E. coli* O157:H7'nin elma dokularında canlı kalması üzerinde, asit adaptasyonunun önemli bir artış sağlamadığı saptanmıştır.

4.9.2 Olgunlaştırma ve depolama süresince *L. monocytogenes*'in canlı kalma oranındaki değişim

HCl kullanılarak pH'sı 4,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde 3 saatlik inkübasyon sonrasında aside adapte edilen *L. monocytogenes* sucuk hamuruna ilave edilmiştir.

ATK⁺ ve ATK⁻ *L. monocytogenes* ilave edilen fermente Türk sucuklarında, olgunlaştırma ve depolama periyodu süresince belirlenen LAB, *Staphylococcus* spp., sayım sonuçları ile pH ve % nem düzeyleri Çizelge 4.43'te verilmiştir.

Çizelge 4.43 Olgunlaştırma (Fermantasyon + Kurutma) ve depolama döneminde *L. monocytogenes* sayısı, LAB sayısı, *Staphylococcus* sayısı, pH ve % nem miktarı

Deneme (ATK ⁺)						Kontrol (ATK ⁻)				
Gün	<i>L. monocytogenes</i>	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem	<i>L. monocytogenes</i>	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem
Hamur										
Bekletme	5,89	6,48	6,43	5,78	59,19	5,69	6,45	6,33	5,75	59,22
Olgunlaştırma										
0	5,87	6,65	6,39	5,80	57,15	5,14	6,52	6,29	5,75	58,62
1	5,78	9,25	6,69	4,65	56,11	5,13	9,14	6,17	4,62	58,51
2	5,57	9,42	6,09	4,42	54,35	4,96	9,31	6,28	4,39	54,00
3	5,51	9,35	6,16	4,56	50,21	4,94	9,36	6,12	4,59	50,47
4	5,43	9,19	6,09	4,54	48,20	4,69	9,20	5,98	4,52	49,19
6	4,76	9,21	6,69	4,48	43,01	4,13	9,32	6,08	4,44	38,49
Depolama										
8	4,44	9,22	6,90	4,61	39,82	3,66	9,12	7,15	4,59	35,88
15	3,53	8,75	6,21	4,74	35,37	2,97	8,79	7,24	4,60	31,04
30	3,37	8,83	5,75	4,76	34,39	2,70	8,57	6,15	4,72	30,06
40	2,89	8,47	5,91	4,74	33,78	<2,00	8,33	6,19	4,80	29,42

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır

Deneme grubunun sucuk hamuruna 5,89 log kob/g düzeyinde ilave edilen ATK^+ *L. monocytogenes* sayısında, sucuk hamurunun bir gece 4 °C'da bekletilmesi sonucunda önemli bir azalma tespit edilmemiştir. Kontrol grubunun sucuk hamuruna 5,69 log kob/g düzeyinde ilave edilen ATK^- *L. monocytogenes* sayısı ise 0,55 log kob/g düzeyinde azalmıştır. Olgunlaştırmanın başlangıcından itibaren *L. monocytogenes* sayısı azalmış, 40. günde deneme grubunda 2,89 log kob/g, kontrol grubunda <2,00 log kob/g düzeyine ulaşmıştır. Asit adaptasyonu *L. monocytogenes*'in fermente Türk sucuğunda yaşama oranında artışa neden olmamıştır. Deneme gruplarının bakteri sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Erkmen (2008), fermente sucuğa ilave edilen *L. monocytogenes*'in, olgunlaştırma periyodu süresince sayısının azaldığını, 25. günden sonra sucuk örneklerinde *L. monocytogenes*'in tespit edilemediğini belirtmiştir. Bu çalışmada ise, 30. güne kadar *L. monocytogenes*'in canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir. *L. monocytogenes*'in canlı kalma düzeyindeki farklılık, olgunlaştırma koşullarının ve kullanılan suşun farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Fermente sucuklarda *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un yaşama düzeyi üzerinde, pH, su aktivitesi ve depolama sıcaklığının önemli bir faktör olduğu saptanmıştır. Fermente sucukların pH'sı 5,2-4,6 iken, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* sayısı sırasıyla, 0-0,9; 0,1-0,5 ve 0-2,2 log kob/g azalmıştır. pH'daki azalmaya bağlı olarak bakteri sayısı azalmış, *E. coli* O157:H7 sayısındaki azalma, *L. monocytogenes*'e kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Hwang vd. (2009). Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama düzeyinin *L. monocytogenes*'e göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır.

Lindqvist ve Lindblad (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente sucuklara ilave edilen, aside adapte edilmiş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica*'nın canlılık düzeyi üzerinde depolama sıcaklığının ve süresinin etkisi araştırılmıştır. 8 °C'da depolanan sucuklarda bakteri sayısının 1,0 logaritma birimi azalması için gerekli süre, *E. coli* O157:H7'de 21 gün, *L. monocytogenes*'te >16 gün ve *Y. enterocolitica*'da 18 gün olarak belirlenmiştir. 20 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda

depolamada ise, *E. coli* O157:H7 için 7-11 gün, *L. monocytogenes* için 4-7 gün ve *Y. enterocolitica* için 1-4 gün gerektiği saptanmıştır. Dourou vd. (2009) tarafından yürütülen çalışmada, Alman kökenli sürülebilir sucukların (Teewurst) 1,5; 4 ve 10 °C'da 30 günlük depolanmasından sonra, *E. coli* O157:H7 sayısının 2,3; 3,2 ve 3,0 log kob/g, *L. monocytogenes* sayısının ise 2,2; 2,6 ve 2,6 log kob/g azaldığı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar tarafından, sıcaklık arttıkça inaktivasyon oranının arttığı rapor edilmiştir. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada 4 °C'da depolanan sucuk örneklerinde, 24 günlük depolama süresince (8. gün-30.gün) *L. monocytogenes* sayısı 0,96 log kob/g azalmıştır.

Francis ve O'Beirne (2001) tarafından yürütülen çalışmada, laktik asit kullanılarak pH'sı 5,5'e ayarlanmış TSB besiyerinde bir saat aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in modifiye atmosferde paketlenmiş sebzelerde yaşama oranının arttığı belirlenmiştir. Sharma vd. (2005) tarafından yürütülen çalışmada, %1 glukoz içeren TSB besiyerinde 24 saat süre ile aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in kavun ve karpuz suyunda termal toleransının artmadığı belirlenmiştir.

Calicioglu vd. (2002), aside adapte edilmiş ve edilmemiş *L. monocytogenes*'in inoküle edildiği sığır etleri, 4 °C'da 24 saat farklı solüsyonlar kullanılarak marine edilmiş ve 60 °C'da 10 saat kurutulmuştur. Adaptasyon uygulamasının *L. monocytogenes*'in kurutma prosesine olan direncini arttırmadığı tespit edilmiştir. Tarafımızca yürütülen bu araştırmada da, asit adaptasyonu ile *L. monocytogenes*'in fermente sucuklarda yaşama oranının artmadığı saptanmıştır.

Gahan vd. (1996), aside adapte olmuş ve olmamış *L. monocytogenes*'in farklı asidik gıdalarda yaşama oranlarını karşılaştırmışlardır. Aside adapte olmuş *L. monocytogenes* ve aside dayanıklı mutant suşu ticari yoğurt ve laboratuvar koşullarında üretilen ev tipi peynirde daha yüksek yaşama oranı göstermiştir. Aside dayanıklı mutant, çedar peyniri gibi sert peynirlerin olgunlaşması sırasında daha yüksek direnç göstermiş ve 70 günlük olgunlaşma döneminden sonra çok fazla sayıda hücre geri alınmıştır. Ayrıca aside adapte edilen *L. monocytogenes*'in aside adapte edilmeyen kültüre kıyasla daha yüksek yaşama oranına sahip olduğu görülmüştür. Yürütülen bu araştırmada ise, asit

adaptasyonu ile *L. monocytogenes*'in fermente Türk sucuğunda yaşama oranında artış sağlanamamıştır.

4.9.3 Olgunlaştırma ve depolama süresince LAB ve *Staphylococcus* sayısı ile pH değerindeki değişim

Sucuk hamuruna starter kültür olarak 6,48- 6,45 log kob/g düzeyinde *L. curvatus* ilave edildiği Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43'te görülmektedir. Fermantasyonun başlamasıyla artan LAB sayısı fermantasyonun 1. gününde, deneme grubunda 9,25 log kob/g, kontrol grubunda 9,14 log kob/g'ye ulaşmıştır. LAB sayısının deneme grubunda 2. günde, kontrol grubunda 3. günde en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Depolama sürecinin başladığı 8. günden sonra bakteri sayısı azalmaya başlamış ve 15. günde deneme grubunda 8,75 log kob/g, kontrol grubunda 8,79 log kob/g düzeyine düşmüştür.

Olgunlaştırma ve depolama süresince, deneme ve kontrol gruplarında tespit edilen LAB sayıları arasındaki farkın istatistik olarak önemsiz olduğu anlaşılmıştır. LAB sayısı arttıkça pH'nın düştüğü tespit edilmiş olup, bu interaksiyon istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Deneme grubunun sucuk hamurunda 5,78, kontrol grubunun sucuk hamurunda 5,75 olarak ölçülen pH değerinin fermantasyonun başlamasıyla düştüğü gözlenmiştir. pH değeri fermantasyonun 1. gününde deneme grubunda 4,65'e, kontrol grubunda 4,62'ye düşmüştür. Olgunlaştırma ve depolama boyunca sucuk örneklerinin pH değerlerinde değişimler gözlenmiştir. Deneme ve kontrol grubu sucuklarında ölçülen pH değerleri arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Laktik asit bakterileri, sucuk hamuruna katılan şekerlerden laktik asit üretmektedir. Laktik asit, üründe pH değerini düşürürken, ekşi tat oluşumuna neden olur. pH düşüşünün etkisiyle, et proteinlerinin denatürasyonu sonucu meydana gelen yapısal değişimler son ürün tekstürünün oluşumuna katkıda bulunur. Laktik asit bakterilerinin inhibitör etkisi, organik asit ve antibakteriyel maddeler üretme yetenekleri ile ilgilidir (Yaman vd. 1998, Çon ve Gökalp 2000, Kayardı ve Gök 2003). Bu araştırmada, LAB sayısı arttıkça pH değerinin düştüğü saptanmıştır ($p<0,01$). Sucukların pH değeri ile *E.*

coli O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayısı arasında bir interaksiyon olduğu, pH düşüşüne paralel olarak, bu bakteri sayılarının azaldığı belirlenmiştir ($p<0,01$).

Fermente Türk sucuklarında *L. monocytogenes*'in gelişimi üzerine, starter kültür kullanımı ve olgunlaşma sıcaklığının etkili olduğu bilinmektedir. Kaya ve Gökalp (2004) tarafından, starter kültür kullanımının *L. monocytogenes*'in gelişimini engellediği gösterilmiştir. Starter kültür kullanılmadan üretilen sucuklarda *L. monocytogenes* sayısı, olgunlaştırmanın 3. gününde 10^3 log kob/g düzeyinde artış göstermiştir. Starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda ise, ilk üç gün içinde, LAB sayısının 10^9 log kob/g düzeyine ulaştığı, pH değerinin 5,0'ın altına düştüğü ve *L. monocytogenes*'in gelişemediği belirtilmiştir. Porto-Fett vd. (2008) tarafından, fermente yarı kuru sucukların, fermentasyonu ve kurutulması aşamasında, pH 5,3 ve 4,8 olduğunda, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 sayısının sırasıyla 0,07- 0,74 log kob/g; 0,03- 1,11 log kob/g azaldığı bildirilmiştir. Yürütülen bu araştırmada ise, *L. monocytogenes* sayısı olgunlaştırmanın başlangıcından itibaren azalmaya devam etmiştir.

Hampikyan ve Uğur (2007) tarafından, fermente sucuklarda başlangıç pH değerinin 5,87-5,90 olduğu ve olgunlaştırmanın 30. gününde pH'nın 4,72-4,82'ye ulaştığı ifade edilmiştir. Yıldız-Turp ve Serdaroğlu (2008)'na göre, başlangıç pH'sı 5,49-5,59 olan fermente sucukların pH değeri, olgunlaştırmanın 12. gününde 4,60-4,82'ye ulaşmıştır. Fermentasyon işlemi süresince artış gösteren laktik asit bakterisine bağlı olarak sucukların pH değerinde düşüş gözlenmektedir. pH değerinin fermentasyon sonrası 5,3 ve altında bir değere ulaşması arzu edilmeyen mikrofloraya karşı nitritin daha etkin olmasını sağlamakta mikrobiyel kalite açısından daha güvenilir bir ürün elde edilmektedir. Fermentasyonun ilk günlerinde pH'da meydana gelen azalma, istenmeyen bakterilerin inhibisyonuna neden olarak, yüksek kaliteli ve güvenli sucuk üretimi gerçekleşmiş olmaktadır. Yürütülen bu araştırmada, aside adapte edilmiş *E. coli* O157:H7'nin fermentasyon süresinde meydana gelen pH değişimlerine karşı direnç gösterdiği ve belli düzeyde canlı kalabildiği görülmüştür.

Erkmen (2009) tarafından yapılan bir araştırmada, starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda, fermentasyon süresince pH'nın hızla azaldığı ve 3. günde en düşük seviyeye

ulaştığı belirtilmiştir (pH 4,82-4,92). Bozkurt (2007), olgunlaştırmanın ilk 3 gününde pH'nın azaldığı (5,84'ten 4,40'a) daha sonra pH'da artış (5,40'tan 5,50'ye) meydana geldiği belirtilmiştir. Bu araştırmada da, özellikle 15. günden itibaren sucuk örneklerinin pH değerlerinde artış görülmüştür. pH değerinde gözlenen bu artış aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya deaminasyonu sonucunda protein olmayan azotlu bileşik konsantrasyonunun artmasından kaynaklanmaktadır.

Erol vd. (1999), bakteriyosin oluşturan starter kültürlerin ilavesiyle, 10^5 kob/g düzeyinde olan *L. monocytogenes* sayısının, olgunlaştırma periyodunun sonunda (14 gün) 0,03 EMS/g seviyesine düştüğü, bakteriyosin oluşturmayan *L. curvatus* suşunu içeren sucuk örneklerinde ise 2,4 EMS/g'a ulaştığı belirtilmiştir. Aynı starter kültürün kullanıldığı bu araştırmada, fermentasyon başlangıcında 5,89-5,69 log kob/g olan *L. monocytogenes* sayısı, 15. günde 3,53-2,97 log kob/g düzeyine ulaşmıştır.

Deneme grubunun sucuk hamuruna 6,43 log kob/g, kontrol grubunun sucuk hamuruna 6,33 log kob/g düzeyinde *Staphylococcus* spp. starter kültür olarak ilave edilmiştir. Olgunlaştırma ve depolama dönemi boyunca *Staphylococcus* spp. sayısında önemli düzeyde bir değişim görülmemiştir (Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43). Deneme ve kontrol gruplarında tespit edilen *Staphylococcus* spp. sayıları arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. İstatistik değerlendirme sonucunda, *Staphylococcus* spp sayısının pH ve nem düzeyinden etkilenmediği anlaşılmıştır. Ensoy (2004), *Micrococcaceae* familyası içinde fermente et ürünlerinde en fazla kullanılan türler, *S. carnosus* ve *S. xylosus*'tur. Bu starter kültürler ürünün lezzet ve renk özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır.

4.9.4 Olgunlaştırma ve depolama süresince ölçülen nem düzeyindeki değişim

Deneme ve kontrol grubunda başlangıçta sırasıyla %59,19 ve %59,22 olan nem miktarı özellikle kurutma döneminde hızlı bir azalma göstermiştir. 8. günde nem miktarı deneme grubunda %39,82 ve kontrol grubunda %35,88 olmuştur. 40. günde deneme grubunda %33,78 ve kontrol grubunda %29,42 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43). Deneme ve kontrol grubunun nem düzeyleri arasındaki fark istatistik

açından önemsiz bulunmuştur. pH değeri ile nem düzeyi arasında pozitif yönlü bir interaksiyon olduğu, pH düşerken nem düzeyinde düşüş gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Nem düzeyi azaldıkça *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in yaşama oranının azaldığı görülmüştür ($p<0,01$).

Kaya ve Gökarp (2004), starter kültür kullanılarak üretilen sucuklarda, olgunlaşmanın başlangıcında %59,38- %60,11 arasında olan nem değeri olgunlaşmanın 12. gününde %36,72- 37,34 olarak bulunmuştur. Dalmış ve Soyer (2008), starter kültürlü sucuklarda, başlangıç nem oranının %60,12 olduğunu ve olgunlaştırmanın 9. gününde %39,5'e düştüğünü belirtmişlerdir. Bu dönemde pH değeri 5,73'ten 4,62'ye azalmıştır. Starter ilave edilen sucuklarda pH, nem ve su aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu da belirtilmiştir. Sucuk üretiminde, LAB tarafından karbohidratlar fermente edilerek laktik asit oluşmakta ve pH düşmektedir. Daha düşük ortam pH'sı, bakteriyel hücrelerin homeostasis sistemini etkileyerek gelişimi inhibe etmektedir. Buna ilaveten pH'nın azalmasına bağlı olarak etin su tutma kapasitesi azalmakta ve kuruma hızlanmaktadır (Gonzalez-Fandos vd. 1999, Soyer vd. 2005). Bu araştırma da ise, olgunlaşmanın başlangıcında %59,19-59,22 olan nem düzeyi, olgunlaşmanın 8. gününde %39,82-35,88 olarak ölçülmüştür.

Casey ve Condon (2002) tarafından, fermente et modelinde pH 4,2'nin *E. coli* O157:H7'ye bakterisidal etkisi üzerine NaCl'in (%4) etkisi araştırılmıştır. Hücrelerin NaCl ve asit varlığında, yalnızca asit olan ortama göre daha iyi yaşama oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu kombine etkinin ortamın su aktivitesinin azalmasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da, nem düzeyi azaldıkça *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in yaşama oranının azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,01$).

4.10 Tuza Adapte Edilmiş *E. coli* O157:H7'nin Türk Sucuğunda Yaşama Düzeyinin Belirlenmesi

Tuza tolerans kazandırılan ve kazandırılmayan *E. coli* O157:H7'nin ilave edildiği fermente Türk sucuklarında, olgunlaştırma ve depolama periyodu süresince belirlenen

Lactobacillus spp., *Staphylococcus* spp. sayım sonuçları ile pH ve % nem düzeyleri ve istatistik analiz sonuçları Çizelge 4.44'te verilmiştir.

Deneme grubunun sucuk hamuruna 5,66 log kob/g düzeyinde ilave edilen tuza tolerans kazandırılmış *E. coli* O157:H7 sayısı, sucuk hamurunun bir gece 4 °C'da bekletilmesi sonucunda 0,42 log kob/g düzeyinde azalmıştır. Kontrol grubunun sucuk hamuruna 5,53 log kob/g düzeyinde ilave edilen tuza tolerans kazandırılmamış *E. coli* O157:H7 sayısı ise 0,89 log kob/g düzeyinde azalmıştır. 6. günde deneme grubu ve kontrol grubundaki *E. coli* O157:H7 sayısının sırasıyla 2,39 ve 2,30 log kob/g olduğu belirlenmiştir. 8. günden itibaren her iki deneme grubundaki *E. coli* O157:H7 sayısı <2,00 log kob/g olarak bulunmuştur. Tuza tolerans kazandırma *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama düzeyinde artışa neden olmamıştır. Deneme ve kontrol grubundaki *E. coli* O157:H7 sayıları arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur.

Deneme grubunun sucuk hamuruna 6,43; kontrol grubunun sucuk hamuruna 6,45 log kob/g düzeyinde LAB ilave edilmiştir. Fermantasyonun başlamasıyla LAB sayısı artmış, 1. günde deneme grubunda 9,22 log kob/g, deneme grubunda 9,14 log kob/g düzeyine ulaşmıştır. LAB sayısı deneme grubunda 4. günde, kontrol grubunda 3. günde en yüksek değere ulaşmıştır (Çizelge 4.44). Deneme ve kontrol grubunun LAB sayısı arasındaki fark önemsiz bulunurken, LAB sayısının artmasına bağlı olarak pH azalmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.44'te görüldüğü üzere, deneme grubunun sucuk hamuruna 6,56 log kob/g, kontrol grubunun sucuk hamuruna 6,33 log kob/g düzeyinde *Staphylococcus* spp. ilave edilmiştir. *Staphylococcus* spp. sayısında ilk 4 gün içinde önemli bir değişiklik olmamış, deneme grubunda 6. günden itibaren *Staphylococcus* spp. sayısı azalırken, kontrol grubunda artış görülmüştür. Fakat bu farklılık istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. pH ve nem düzeyindeki düşüş, *Staphylococcus* spp. üzerinde önemli bir etki oluşturmamıştır.

Çizelge 4.44 Olgunlaştırma (Fermantasyon + Kurutma) ve depolama döneminde *E. coli* O157:H7 sayısı, LAB sayısı, *Staphylococcus* sayısı, pH ve % nem miktarı

Deneme (ATK ⁺)						Kontrol (ATK ⁻)				
Gün	<i>E. coli</i> O157:H7	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem	<i>E. coli</i> O157:H7	LAB	<i>Staph. spp.</i>	pH	% Nem
Hamur										
Bekletme	5,66	6,43	6,56	5,76	59,56	5,53	6,45	6,33	5,75	59,22
Olgunlaştırma										
0	5,24	6,62	6,31	5,74	56,95	4,64	6,52	6,29	5,75	58,62
1	4,84	9,22	6,28	4,59	55,92	4,37	9,14	6,17	4,62	58,51
2	4,38	9,32	6,25	4,36	53,62	3,89	9,31	6,28	4,39	54,00
3	4,13	9,22	6,19	4,54	49,32	3,68	9,36	6,12	4,59	50,47
4	3,72	9,43	6,14	4,54	48,74	3,51	9,20	5,98	4,52	49,19
6	2,39	9,25	5,98	4,44	39,27	2,30	9,32	6,08	4,44	38,49
Depolama										
8	<2,00	9,16	5,92	4,63	38,79	<2,00	9,12	7,15	4,59	35,88

* Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır

Deneme grubunun sucuk hamurunda 5,76, kontrol grubunun sucuk hamurunda 5,75 olarak ölçülen pH değerinin fermantasyonun başlamasıyla düştüğü gözlenmiştir. pH değeri, fermantasyonun 1. gününde deneme grubunda 4,59'a, kontrol grubunda 4,62'ye düşmüştür. Olgunlaştırma ve depolama boyunca sucuk örneklerinin pH değerlerinde değişimler gözlenmiştir (Çizelge 4.44). Deneme ve kontrol grubunun pH değerleri arasındaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. LAB sayısı ile pH arasında negatif yönlü bir interaksiyon olduğu, LAB sayısı arttıkça pH değerinin düştüğü tespit edilmiştir ($p<0,01$).

Deneme ve kontrol grubunda başlangıçta sırasıyla %59,56 ve %59,22 olan nem miktarı özellikle kurutma döneminde hızlı bir azalma göstermiştir. 8. günde nem miktarı deneme grubunda %38,79 ve kontrol grubunda %35,88 olmuştur. Nem düzeyi 8. günde, deneme grubunda %38,79 ve kontrol grubunda %35,88 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.46). İstatistik değerlendirme sonucunda, deneme gruplarının nem düzeyleri arasında farklılık olmadığı anlaşılmıştır. LAB sayısındaki artışla beraber pH düşmekte ve nem düzeyi azalmaktadır ($p<0,01$). pH ve nem düzeyi azaldıkça *E. coli* O157:H7 sayısı azalmıştır ($p<0,01$).

5. SONUÇ

L. monocytogenes ve *E. coli* O157:H7'nin asit adaptasyonuna yönelik yürütülen çalışmalarda elde edilen veriler birbirinden farklılık göstermektedir. Bu patojenler üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılan suşlar birbirinden farklıdır. Dolayısıyla asit adaptasyonu üzerinde suş farklılıklarının çok önemli olduğu görülmüştür. Asit adaptasyonunun türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca asit adaptasyonu üzerinde, asit çeşidi, pH ve adaptasyon süresinin önemli bir etken olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in farklı asit tipleri, farklı pH'lar ve farklı adaptasyon süreleri kullanılarak aside tolerans kazandırılabilceği gösterilmiştir. Sonuç olarak bu patojenlerin orta asidik (pH 4,5-5,5) koşullara maruz kalmaları durumunda aside tolerans kazandıkları ve kendileri için öldürücü olan yüksek asitli ortamda uzun süre belli düzeylerde canlı kalabildikleri belirlenmiştir. Ayrıca asit adaptasyonu ile, *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama düzeyinin arttığı, fakat *L. monocytogenes*'in yaşama düzeyi üzerinde artışa neden olmadığı saptanmıştır.

Araştırma sonunda, *E. coli* O157:H7'nin tuza tolerans kazandığı, *L. monocytogenes*'in tuz toleransında artış olmadığı saptanmıştır. Tuz toleransı, *E. coli* O157:H7'nin fermente Türk sucuğunda yaşama oranında artış sağlamamıştır.

Aside adapte olan patojenler gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından birçok risk taşımaktadır. Bu tür patojenler asidik gıdalarda canlılığını sürdürerek gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Gıda ile vücuda alınan bu patojenler mide asitliğine ve makrofajlara direnç gösterirler. Bu tür patojenlerin virülenslikleri artar ve infeksiyöz dozları düşer. Ayrıca yüksek sıcaklık, tuzluluk, soğukta saklama ve dondurma-çözdürme gibi diğer çevresel streslere de direnç kazanmakta olup, gıda endüstrisinde kullanılan gıda muhafaza yöntemlerinin yeniden gözden geçirilmesini zorunlu kılmaktadır. ATK mekanizmasının anlaşılması daha etkili gıda güvenlik sistemlerinin

oluşturulmasına yardım edecek ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde rol oynayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abee, T. and Wouters, J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50; 65-91.
- Adhikari, S. 2005. The impact of organic acids and pH on the virulence factor expression of *E. coli* O157:H7. Master Thesis, North Carolina State University, 129 p.
- Anonymous. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed. A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd.Şti., 358 s., Ankara.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arnold K.W. and Kaspar, C.W. 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 61; 2037-2039.
- Azizoğlu, R.O. 2005. Influence of antibiotic, acid, and salt stress on resistance of *Escherichia coli* O157:H7. Master thesis, Carolina State University, 135 p.
- Bang, I.S., Kim, B.H., Foster, J.W. and Park, Y.K. 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 182(8); 2245-2252.
- Bang, W. and Drake, M.A. 2005. Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiology*, 22(4); 301-309.
- Benjamin, M.M. and Datta, A.R. 1995. Acid tolerance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61; 1669-1672.
- Berk, P.A., Jonge, R., Zwietering, M.H., Abee, T. and Kieboom, J. 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology*, 99; 859-866.
- Berry, E.D. and Cutter, C.N. 2000. Effects of acid adaptation of *E. coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4); 1493-1498.
- Berry, E.D., Barkocy-Gallagher, G.A. and Siragusa, G.R. 2004. Stationary-phase acid resistance and injury of recent bovine *Escherichia coli* O157 and non-O157 Biotype 1 *Escherichia coli* isolates. *Journal of Food Protection*, 67(3); 583-590.
- Bhagwat, A.A., Tan, J., Sharma, M., Kothary, M., Low, S., Tall, B.D. and Bhagwat, M. 2006. Functional heterogeneity of *rpoS* in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7); 4978-4986.

- Bjornsdottir, K., Breidt J.F. and McFeeters, R.F. 2006. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1); 660-664.
- Bolton, L.F. and Frank, J.F. 1999. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology*, 29; 350-353.
- Bozkurt, H. 2007. Comparison of the effects of sesame and *Thymbra spicata* oil during the manufacturing of Turkish dry-fermented sausage. *Food Control*, 18; 149-156.
- Breidt, J.R., Hayes, J.S. and Mcfeeters, R.F. 2004. Independent effects of acetic acid and pH on survival of *Escherichia coli* in simulated acidified pickle products. *Journal of Food Protection*, 67(1); 12-18.
- Browne, N. and Dowds, B.C.A. 2002. Acid stres in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 92; 404-414.
- Buchanan, R.L. and Edelson, R.L. 1999. pH-dependent stationary- phase acid resistance response of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *Journal of Food Protection*, 62(3); 211-218.
- Buchanan, R.L., Edelson-Mammel, S.G., Boyd, G. and Marmer, B.S. 2004. Influence of acidulant identity on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 21; 51-57.
- Buncic, S. and Avery, S.M. 1998. Effects of cold storage and heat acid shocks on growth and verotoxins 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 15; 319-328.
- Caggia, C., Scifo, G.O., Restuccia, C. and Randazzo, C.L. 2009. Growth of acid-adapted *L. monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Control*, 20; 59-66.
- Calicioglu, M., Faith, N.G., Buege, D.R. and Luchansky, J.B. 2001. Validation of a manufacturing process for fermented, semidry Turkish soudjouk to control *E. coli* O157:H7. *Journal Food Protection*, 64; 1156-1161.
- Calicioglu, M., Sofos, J.N., Samelis, J., Kendall, P.A. and Smith, G.C. 2002. Destruction of acid-and non-adapted *Listeria monocytogenes* during drying and storage of beef jerky. *Food Microbiology*, 19; 545-559.
- Campbell, J., Bang, W., Isonhood, J., Gerard, P.D. and Drake, M.A. 2004. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 21; 727-735.
- Casey, P.G. and Condon, S. 2002. Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *International Journal of Food Microbiology*, 76; 199-206.

- Castanie-Corne, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. and Foster, J.W. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181; 3525-3535.
- Cataldo, G., Conte, M.P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M.G., Superti, F. and Longhi, C. 2007. Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology*, 103; 85-193.
- Cheng C.M. and Kaspar, C.W. 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 15; 157-166.
- Cheng, H.Y. and Chou, C.C. 2001. 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*, 70; 189-195.
- Cheng, H.Y., Yu, R.C. and Chou, C.C. 2003. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Research International*, 36; 49-56.
- Cheville, A.M., Arnold, K.V., Buchrieser, C., Cheng, C.M. and Kaspar, C.W. 1996. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5); 1822-1824.
- Choi, S.H., Baumler, D.J. and Kaspar, C.W. 2000. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9); 3911-3916.
- Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B. and Bingöl, E.B. 2007. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control*, 18; 30-32.
- Conte, M.P., Petrone, G., Biase, A.M., Ammendolia, M.G., Superti, F. and Seganti, L. 2000. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocytes-like cells and macrophage-like cells. *Microbial Pathogenesis*, 29; 137-144.
- Conte, M.P., Petrone, G., Biase, A.M., Longhi, C., Penta, M., Tinari, A., Superti, F., Fabozzi, G., Visca, P. and Seganti, L. 2002. Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria monocytogenes* in THP-1 human macrophages activated by gamma interferon. *Infection and Immunity*, 70(8); 4369-4378.
- Coşansu, S. and Ayhan, K. 2000. Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain in Turkish soudjouck during fermentation, drying and storage periods. *Meat Science*, 54; 407-411.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M. and Hill, C. 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀F₁ -ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology*, 60; 137-146.

- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. 1994, Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *Journal of Food Protection*, 57(2); 97-103.
- Çakır, İ. 2000. *Escherichia coli* O157:H7. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. baskı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını, 522 s., Ankara.
- Çakmakçı, L. ve Karahan, A.G. 1995. Hidrojen iyon konsantrasyonu. Mikrobiyolojiye Giriş, 215 s., Ankara.
- Çon, A.H. and Gökalp, H.Y. 2000. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*, 55; 89-96.
- Dalmış, Ü. and Soyer, A. 2008. Effect of processing methods and starter culture (*Staphylococcus xylosus* and *Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage. *Meat Science*, 80; 345-354.
- Data, A.R. and Benjamin, M.M. 1997. Factors controlling acid tolerance of *Listeria monocytogenes*: effects of nisin and other ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10); 4123-4126.
- Deng, Y., Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 1999. Tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *Journal of Applied Microbiology*, 86; 203-210.
- Dikici, A. 2009. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(3); 59-68.
- Dlamini, B.C. and Buys, E.M. 2009. Survival and growth of acid adapted *Escherichia coli* strains in broth at different pH levels. *Journal of Food Safety*, 29; 484-497.
- Doğan, H.B. 2000. *Listeria monocytogenes*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. baskı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını, 522 s., Ankara
- Dourou, D., Porto-Fett, A.C.S., Shoyer, B., Call, J.E., Nychas, G.J.E., Illg, E.K. and Luchansky, J.B. 2009. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in teewurst, a raw spreadable sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 130; 245-250.
- Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P. and Labadie, J. 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4); 1491-1498.
- Duffy, G., Riordan, D.C., Sheridan, J., Call, J.E., Whiting, R.C., Blair, S. and McDowell, D.A. 2000. Effect of pH on survival, thermotolerance, and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7 during simulated fermentation and storage. *Journal Food Protection*, 63; 12-18.

- Dykes, G.A. and Moorhead, S.M. 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3); 161-166.
- Ensoy, Ü. 2004. Hindi sucuğu üretiminde starter kültür kullanımı ve ısıtım işlem uygulamasının ürün karakteristikleri üzerine etkisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 138 s., Ankara.
- Erdoğrul, Ö ve Erbilir, F. 2005. Resistance of *Escherichia coli* to acid and alkali pH. *Annals of Microbiology*, 55(2); 91-95.
- Erkmen, O. 2008. Modeling the effects of sucuk production technique on *L. monocytogenes*, aerobic bacteria and lactic acid bacteria during ripening and storage. *Food and Bioprocess Technology*, 1; 220-226.
- Erkmen, O. 2009. Survival of *Staphylococcus aureus* and aerobic bacteria in sucuks made from starter culture and *Thymra spicata* during manufacturing and storage. *Food and Bioprocess Technology*, 2; 62-67.
- Erol, İ., Çelik, T.H., Şireli, U.T. ve Özdemir, H. 1999. Bakteriyosin oluşturan starter kültürlerin fermente Türk sucuklarında *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23; 793-802.
- Esvan, H., Minet, J., Lachie, C. and Cormier, M. 2000. Proteins variations in *Listeria monocytogenes* exposed to high salinities. *International Journal of Food Microbiology*, 55; 151-155.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W. and Power, D. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84; 207- 216.
- Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *L. monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 15; 103-105.
- Farewell, A., Kvint, K. and Nystrom, T. 1998. Negative regulation by *rpoS* a case of sigma factor competition. *Molecular Microbiology*, 29; 1039-1051.
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C.P. and Boor, K.J. 2003. Role of *Listeria monocytogenes* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5); 2692-2698.
- Foley, D.M., Trimboli, S.L., Lamb, J., Gogley, J., Thompson, J., Caporaso, F., Calicchia, M. and Prakash, A. 2005. Acid adaptation does not increase the resistance of *Listeria monocytogenes* to irradiation in a seafood salad. *International Journal of Food Microbiology*, 99; 147-156.
- Foster, J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, 173(21), 6896-6902.

- Foster, J.W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. *Journal of Bacteriology*, 175(7); 1981-1987.
- Foster, J.W. and Hall, H.K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 172 (2); 771-778.
- Foster, J.W. and Hall, H.K. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 5129-5153.
- Francis, G.A. and O'Beirne, D. 2001. Effects of acid adaptation on the survival of *Listeria monocytogenes* on modified atmosphere packaged vegetable. *International Journal of Food Science and Technology*, 36; 477-487.
- Gahan, C.G.M. and Hill, C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 50; 93-100.
- Gahan, C.G.M., O'Driscoll, B and Hill, C. 1996. Acid Adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 3128-3132.
- Gandhi, M. and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1); 1-15.
- Garner, M.R., James, G.K., Callahan, M.C. and Boor, K.J. 2006. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Applied Environmental Microbiology*, 72(8); 5384-5395.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. and Doyle, M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 58; 2513-2516.
- Gonzales-Fandos, M.E., Sierra, M., Garcia-Lopez, M.L., Garcia-Fernandez, M.L. 1999. The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *S. aureus* in two Spanish dry sausages. *Meat Science*, 52; 411-419.
- Goodson, M. and Rowbury, R.J. 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *E. coli* at a sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*, 8; 77-79.
- Gorden, J. and Small, P.L.C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity*, 61(1); 364-367.
- Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B.B. and Knøchel, S. 2004. Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 39; 528-532.

- Greenacre, E.J., Brocklehurst, T., Waspe, C.R., Wilson, D.R. and Wilson, P.D.G. 2003. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organics acids at 20 °C optimization and modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7); 3945-3951.
- Greenacre, E.J. and Brocklehurst, T.F. 2006. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, 112; 62-65.
- Gutierrez, C., Abee, T. and Booth, I.R. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28; 233-244.
- Gürbüz, F., Başpınar, E., Çamdeviren, H. ve Keskin, S. 2003. Tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi. 17-27 s., Ankara.
- Halkman, A.K., Noveir, M.R. ve Doğan, H.B. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 serotipi. Orkim Ltd. Yayını, Sim Matbaacılık Ltd, 44 s., Ankara.
- Hampikyan, H. and Uğur, M. 2007. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). *Meat Science*, 76; 327-332.
- Hengge-Aronnis, R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current Opinion Microbiology*, 2; 148-152.
- Heyde, M. and Portalier, R. 1990. Acid shock proteins of *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 69; 19-25.
- Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D. and Gahan, G.M. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*, 12(2-3); 273-283.
- Hill, C., O'Driscoll, B. and Booth, I. 1995. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28; 245-254.
- Hickey, E.W. and Hirshfield, I.N. 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4); 1038-1045.
- Hwang, C.A., Porto-Fett, A.C., Juneja, V.K., Ingham, S.C., Ingham, B.H. and Luchansky, J.B. 2009. Modeling the survival of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* during fermentation, drying and storage of soudjouk-style fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 129; 244-252.
- Ikeda, J.S., Samelis, J., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. 2003. Acid adaptation does not promote survival of growth *Listeria monocytogenes* on fresh beef following acid and nonacid decontamination treatment. *Applied Environmental Microbiology*, 69; 4123-4128.

- Jonge, R., Ritmeester, W.S. and Leusden, F.M. 2003. Adaptive responses of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and other *S. Typhimurium* and *Escherichia coli* O157 to low pH environments. *Journal of Applied Microbiology*, 94; 625-632.
- Jordan, K.N. and Davis, K.W. 2001. Sodium chloride enhances recovery and growth of acid stressed *E. coli* O157:H7. *Letters Applied Microbiology*, 32; 312-315.
- Kara, A.A., Algur, Ö.F ve Kaya, M. 1999. Erzurum piyasasından temin edilen beyaz ve civil peynirlerinden, *Listeria* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu. *Turkish Journal of Biology*, 23; 331-337.
- Kaya, M ve Gökalp, H.Y. 2004. Sucuk üretiminde starter kültür kullanımının ve farklı nitrit dozlarının *Listeria monocytogenes*'in gelişimi üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28; 1121-1127.
- Kayardı, S. and Gök, V. 2003. Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). *Meat Science*, 66; 249-257.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J. and Wiedmann, M. 2003. *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions. *Journal of Bacteriology*, 185(19); 5722-5734.
- Kieboom, J. and Abee, T. 2006. Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(15); 5650-5653.
- Ko, R., Smith, L.T. and Smith, G.M. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *L. monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 176; 426-431.
- Koutsoumanis, P.K, Kendall, P.A. and Sofos, J.N. 2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12); 7514-7516.
- Koutsoumanis, K.P. and Sofos, J.N. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 38; 321-326.
- Lee, S., Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phage acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 176(5); 1422-1426.
- Leyer, G.J. and Johnson, E.A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6); 2075-2080.
- Leyer, G.J. and Johnson, E.A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6); 1842-1847.

- Leyer, G.J., Wang, L. and Johnson, E.A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 3752-3755.
- Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennent, G.N. and Foster, J.W. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9); 3094-3100.
- Lindqvist, R. and Lindblad, M. 2009. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *International Journal of Food Microbiology*, 129; 59-67.
- Lou, Y. and Yousef, A.E. 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4); 1252-1255.
- Mao, Y., Doyle, M.P. and Chen, J. 2006. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Letters in Applied Microbiology*, 42; 642-647.
- Merrell, D.S. and Camili, A. 2002. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 5; 51-55.
- Norrung, B., Andersen, J.K. and Schlundt, J. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 53; 195-203.
- O'driscoll, B., Gahan, C.G.M. and Hill, C. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5); 1693-1698.
- Öz, F., Kaya, M ve Aksu, M.İ. 2002. Sucuk üretiminde farklı nitrit dozlarının ve starter kültür kullanımının *Escherichia coli* O157:H7'nin gelişimi üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26; 651-657.
- Park, S., Smith, L.T. and Smith, G.M. 1995. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12); 4378-4381.
- Park, S., Worobo, R. and Durst, R. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A Literature Review. *Critical Reviews in Food Sci and Nutrition*, 39(6); 481-502.
- Patchett, R.A., Kelly, A.F. and Kroll, R.G. 1992. Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58; 3959-3963.
- Phan-Thanh, L. and Mahouin, F. 1999. A proteomic approach to study the acid response in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis*, 20; 2214-2224.

- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. and Alige, S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 55; 121-126.
- Rees, C.E.D., Dodd, C.E.R., Gibson, P.T., Booth, I.R. and Stewart, G.S.A.B. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. International Journal of Food Microbiology, 28; 263-275.
- Porto-Fett, A.C.S., Hwang, C.A., Call, J.E., Juneja, V.K., Ingham, S.C., Ingham, B.H. and Luchansky, J.B. 2008. Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. Food Microbiology, 25; 793-801.
- Rhee, M.S., Lee, S.Y., Dougherty, R.H. and Kang, D.H. 2003. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, 69(5); 2959-2963.
- Ribeiro, M.H., Manha, S. and Brito, L. 2006. The effects of salt and pH stress on the growth rates of persistent strains of *Listeria monocytogenes* collected from specific ecological niches. Food Research International, 39(7); 816-822.
- Riesenberg, W.M.R., Bearson, B., Foster, J.W. and Curtiss, R. 1996. Role of acid tolerance response in virulence of *Salmonella* Typhimurium. Infection and Immunity, 1085-1092.
- Riordan, D.C.R., Duffy, G., Sheridan, J.J., Whiting, R.C., Blair, J.S. and McDowell, D.A. 2000. Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. Applied and Environmental Microbiology, 1726-1729.
- Roering, A.M., Luchansky, J.B., Ihnot, A.M., Ansay, S.E., Kaspar, C.W. and Ingham, S.C. 1999. Comparative survival of *Salmonella* Typhimurium DT104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. International Journal of Food Microbiology, 46(3); 263-269.
- Russell, N.J., Evans, R.I., Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A.V. and Abee, T. 1995. Membrane as a target for stress adaptation. International Journal of Food Microbiology, 28; 255-261.
- Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. International Journal of Food Microbiology, 45; 185-193.
- Ryu, J.H., Deng, Y. and Beuchat, L.R. 1999. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. Journal Food Protection, 62; 451-455.

- Sainz, T., Perez, J., Villaseca, J., Hernández, U., Eslava, C., Mendoza, G. and Wachter, C. 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3); 357-367.
- Samelis, J., Ikeda, J.S. and Sofos, J.N. 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 95; 563-575.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A. and Smith, G.C. 2005. Survival or growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a model system of fresh meat decontamination runoff waste fluids and its resistance to subsequent lactic acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10); 6228-6234.
- Schurman, J.J. 2001. Antibacterial activity of hydrogen peroxide against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in fruit juices, both alone and in combination with organic acids. Master Thesis, Blacksburg, 54 p., Virginia.
- Sergelidis, D. and Abraham, A. 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control*, 20; 1-10.
- Severino, P., Dussurget, O., Veñcio, R.Z.N., Dumas, E., Garrido, P., Padilla, G., Piveteau, P., Lemaître, J.P., Kunst, F., Glaser, P. and Buchrieser, C. 2007. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19); 6078-6088.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegmund, H. and Mcmeekin, T. 2002. Response of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurement of intracellular pH and viable counts. *International Journal of Food Microbiology*, 75; 89-97.
- Shabala, L., Lee, S.H., Cannesson, P. and Ross, T. 2008. Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71(6); 1169-1177.
- Sharma, M., Adler, B.B., Harrison, M.D. and Beuchat, L.R. 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology*, 41; 448-453.
- Singh, M., Simpson, S.M., Mullins, H.R. and Dickson, J.S. 2006. Thermal tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef during storage. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(4); 439-446.

- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A. Smith, G.C. and Sofos, J.N. 2007. Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. International Journal of Food Microbiology, 120; 237-249.
- Skandamis, P.N. Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiology, 25; 294-303.
- Smith J.L. 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid problems. Journal Food Protection, 66; 1292-1303.
- Sorelles, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. Journal Food Protection, 52; 571-573.
- Soyer, A., Ertas, A.H. and Üzümcüoğlu, Ü. 2005. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). Meat Science, 69; 135-141.
- Stopforth, J.D., Ikeda, J.S., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. 2004. Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and store. International Journal of Food Microbiology, 90(1); 51-61.
- Stopforth, J.D., Skandamis, P.N., Geornaras, I. and Sofos, J.N. 2007. Acid tolerance of acid-adapted and nonacid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. Food Microbiology, 24(5); 530-538.
- Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M. and Boor, K.J. 2004. σ^B - dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. Microbiology, 150; 3843-3855.
- Tamplin, M.L. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human gastric fluid. Applied and Environmental Microbiology, 71(1); 320-325.
- Temiz, A. 2000. Mikrobiyolojik sayım yöntemleri. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi, 291 s., Ankara.
- Tosun, H. 2003. Bazı patojen bakterilerin aside tolerans kazanmasının tanımlanması ve gıda sanayindeki önemi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 179 s., İzmir.
- Tosun, H. and Gönül, Ş.A. 2003. Acid adaptation protects *Salmonella* Typhimurium from environmental stresses. Turkish Journal of Biology, 27; 31-36.

- Tosun, H. and Gönül, Ş.A. 2005. The effect of acid adaptation conditions on acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7. Turkish Journal of Biology, 29; 197-202.
- Tsai, Y. and Ingham, S.C. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. Journal of Food Protection, 60 (7); 751-755.
- Tunail, N. 2000. Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. baskı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını, 522 s., Ankara.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyel Gelişmeye etki eden faktörler. Mikrobiyoloji, 435 s., Ankara.
- Uyttendaele, M., Vankeirsbilck, S. and Debevere, J. 2001. Recovery of heat-stressed *E. coli* O157:H7 from ground beef and survival of *E. coli* O157:H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7 °C and 22 °C. Food Microbiology, 18; 511-519.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hebraud, M. and Labadie, J. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 86, 469-476.
- Verheul, A., Hagting, A., Amezaga, M.R, Booth, I.R., Rombouts, F.M. and Abee, T. 1995. A di- and tripeptide transport system can supply *L. monocytogenes* Scott A with amino acids essential for growth. Applied Environmental Microbiology, 61; 226-233.
- Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C. and Lebert, A. 1998. Effects of pH or a stress on growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 42; 71-77.
- Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E. and Lange, M. 2003. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. International Journal of Food Microbiology, 82; 121-131.
- Waterman, S.R. and Small, P.L.C. 1998. 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 and Environmental Microbiology, 61(12); 4378-4381.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L. and Bark D.H. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157 H7 in mayonnaise and mayonnaise- based sauces at room and refrigerated temperatures. Journal of Food Protection, 57(7); 629-631.

- Wemekamp-Kamphuis, H., Wouters, J.A., Leeuw, P.L.A., Hain, T., Chakraborty, T. and Abee, T. 2004. Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and free survival in *Listeria monocytogenes* EGD. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6); 3457-3466.
- Yaman, A., Gökalp, H.Y. and Çon, A.H. 1998. Some characteristics of lactic acid bacteria present in commercial sucuk samples. *Meat Science*, 49(4); 387-397.
- Yıldız-Turp, G. and Serhatoğlu, M. 2008. Effect of replacing beef fat with hazelnut oil on quality characteristics of sucuk: A Turkish fermented sausage. *Meat Science*, 78; 447-454.
- Yuk, H.G. and Marshall, D.L. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6); 3500-3505.
- Yuk, H.G. and Schneider, K.R. 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology*, 23; 694-700.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma YAMAN ÖZTÜRK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 03.02.1975

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (1993)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü (1998)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü (2002)

Doktora : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
(2010)

Yayınları

Çakır, İ., H.B. Doğan, H. Kuleaşan, F. Yaman, A.K. Halkman 2000. Effect of Novobiocin, Acriflavin and Cefixime-Tellurite on Inhibition of Cohabitant Flora for the Isolation of Escherichia coli O157:H7 Serotype. Blacksea and Central Asian Symposium on Food Technology. Book of Abstracts, 33.

Kuleaşan, H., Ö. Fakıoğlu, F. Yaman, İ. Çakır, H.B. Doğan, A.K. Halkman 2001. E. coli O157:H7 İzolasyonunda Sıcaklığın Etkisi. XII. Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı 25-28.

Yaman, F., Seçer, S. Halkman, A.K. Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata*) ve Levrek Balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) Vibriosis ve Pasteurellosis'in araştırılması. Orlab'on-line Mikrobiyoloji Dergisi.

Yaman, F., Esendal, Ö. Balıklarda Probiyotik Kullanımı. Orlab'on-line Mikrobiyoloji Dergisi