

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
(KIRIKKALE ÜNİV. ORT. PROG.)**

**ZAHTERİN (*THYMBRA SPICATA* L.) FERMENTE TÜRK
SUCUKLARINDA *ESCHERICHIA COLI* VE *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Serhat AL**

**Danışman
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Ocak 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
(KIRIKKALE ÜNİV. ORT. PROG.)**

**ZAHTERİN (*THYMBRA SPICATA* L.) FERMENTE TÜRK
SUCUKLARINDA *ESCHERICHIA COLI* VE *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Serhat AL**

**Danışman
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDK-2015-5648 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Serhat AL

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Zahterin (*Thymbra Spicata* L.) Fermente Türk Sucuklarında *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium* Üzerine Antimikrobiyel Etkilerinin Belirlenmesi” adlı doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Arş. Gör. Serhat AL

Danışman

Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM danışmanlığında Serhat AL tarafından hazırlanan **“Zahterin (*Thymbra spicata* L.) Fermente Türk Sucuklarında *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium* Üzerine Antimikrobiyel Etkilerinin Belirlenmesi”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

31/01/2017

JÜRİ

İmza

Danışman : Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

.....

(Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Mustafa ATESEVER

.....

Üye : Prof. Dr. Filiz KÖK

.....

Üye : Prof. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY

.....

Üye : Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve hiçbir konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse de teorik olarak bilgi ve deneyimleri ile yol göstererek destek olan Sayın Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun HIZLISOY'a, doktora programına kabul ederek birlikte çalışma onurunu yaşatan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN'a sonsuz teşekkürlerimi iletirim. Çalışmanın çeşitli kısımlarında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Aytaç AKÇAY, Doç. Dr. Cem Vural ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Vedat YILMAZ hocalarıma da teşekkürü borç bilirim. Ayrıca bana hayatımda her türlü desteği sağlayan eşim Özge AL'a ve canım aileme teşekkür ederim.

Serhat AL

Kayseri, Ocak 2017

**ZAHTERİN (*THYMBRA SPICATA* L.) FERMENTE TÜRK SUCUKLARINDA
ESCHERICHIA COLI VE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ÜZERİNE
ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Serhat AL

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak, 2017**

Danışman: Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

ÖZET

Bu çalışmada *Thymbra spicata* L. subsb. *spicata* uçucu yağının, fermente Türk sucuklarında *Escherichia coli* ve *Salmonella* Typhimurium üzerine antimikrobiyel etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Hidrodistilasyon metodu ile elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonu Headspace GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) tekniği ile belirlendi. Uçucu yağın bazı patojenler üzerine *in vitro* antimikrobiyel etkinliğinin değerlendirilmesi için agar disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanıldı. Uçucu yağın fermente sucuklarda *E. coli* ve *S. Typhimurium* üzerine antimikrobiyel etkinliğinin belirlenmesi için 300 ve 500 ppm ekstrakt içeren 6 deneysel sucuk grubu oluşturuldu. Ayrıca 300 ppm ve 500 ppm uçucu yağ içeren deney ve kontrol grupları için Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi 47 öğretim üyesinin katılımıyla organoleptik muayene gerçekleştirildi. Uçucu yağın verimliliği %2.41 olarak belirlendi. Uçucu yağda başta karvakrol (%43.60), γ-terpinen (%16.69) ve p-simen (%13.97) olmak üzere toplam 47 bileşen (%99.41) tespit edildi. Uçucu yağın *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* için Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC değerleri) belirlendi.

Sonuç olarak zahter uçucu yağının, *in vitro* koşullarda çalışmada test edilen patojenlere karşı etkili olduğu, bununla birlikte fermente Türk sucuğuna antimikrobiyel etki gösterebilecek miktarlarda ekstrakt katılması durumunda, ürünün organoleptik özelliklerinin olumsuz yönde etkilendiği tespit edildi. Doğal antimikrobiyellerin, gıda teknolojilerinde, gıda katkı maddelerine alternatif olarak, gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi ve muhafaza süresinin uzatılması gibi amaçlarla kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyel aktivite, *Thymbra spicata* L., Fermente Türk sucuğu, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium

**ANTIMICROBIAL EFFECTS OF ZAHTER (*THYMBRA SPICATA* L.) ON
ESCHERICHIA COLI AND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM IN TURKISH
FERMENTED SAUSAGES**

Serhat AL

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Veterinary Food Hygiene and Technology**

PhD Thesis, January, 2017

Supervisor: Associated Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical composition and antimicrobial activities of the of *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* volatile oils on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in the fermented Turkish sausage (sucuk).

Hydrodistillation method was used to obtain the volatile oil for which the chemical profile was detected by GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry). Agar disc diffusion and broth microdilution methods were used to evaluate the *in vitro* antimicrobial effect of the extract. The antimicrobial effect of the volatile oil on *E. coli* and *S. Typhimurium* was detected by 6 experimental fermented sucuk groups with added 300 and 500 ppm of extract. The organoleptic analyses of the experimental groups with added 300 and 500 ppm extract as well as the control group was carried out by the attendance of 47 academic personal of Erciyes University, Veterinary Faculty.

The productivity of the volatile oil was determined as 2.41%. Total of 47 components (99.41%) were assayed including mainly carvacrol (43.6%), γ -terpinene (16.69%) and p-cymen (13.97%). The minimal inhibitory concentrations (MIC values) of volatile oil were specified for *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

The results of this study revealed that the volatile oil of zahter had antimicrobial effect on the related pathogens under *in vitro* conditions. However, increased amount of extract use to be antimicrobiologically effective in fermented Turkish sucuk matrix might negatively affect the organoleptic properties of the product. More research is needed to lay down the possibility of the natural antimicrobial use, as an alternative to the food additives, in food technology to prevent foodborne diseases and to extend the shelf life of food products.

Keywords: Antimicrobial activity, *Thymbra spicata* L., Fermented Turkish Sausage, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium.

İÇİNDEKİLER

ZAHTERİN (*THYMBRA SPICATA* L.) FERMENTE TÜRK SUCUKLARINDA *ESCHERICHIA COLI* VE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	7
2.1.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	9
2.1.1.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i> 'lerin Serogrupları	9
2.1.1.2. EPEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular	10
2.1.1.3. EPEC Epidemiyolojisi	10
2.1.1.4. EPEC İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	11
2.1.1.5. EPEC Enfeksiyonlarında Patojenite.....	12
2.1.2. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	14
2.1.2.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> 'lerin Serogrupları	14
2.1.2.2. ETEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular	15
2.1.2.3. ETEC'in Epidemiyolojisi.....	16
2.1.2.4. ETEC Enfeksiyonlarında Patojenite	16
2.1.2.4.1. Enterotoksinler	16

2.1.2.4.2. Kolonizasyon Faktör Antijenleri (CFA)	18
2.1.3. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC)	19
2.1.3.1. EIEC Epidemiyolojisi	20
2.1.3.2. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> 'lerin Serogrupları	20
2.1.3.3. EIEC Enfeksiyonlarında Patojenite	21
2.1.4. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC) ve <i>E. coli</i> O157:H7	21
2.1.4.1. EHEC ve <i>E. coli</i> O157:H7'nin Mikrobiyolojik Özellikleri	22
2.1.4.2. EHEC Epidemiyolojisi.....	23
2.1.4.3. EHEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular.....	24
2.1.4.4. <i>E. coli</i> O157:H7 İzolasyonu ve İdentifikasyonu	25
2.1.4.5. EHEC Enfeksiyonlarında Patojenite	25
2.1.5. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	27
2.1.5.1. Enteroagregatif <i>E. coli</i> 'lerin Serogrupları.....	27
2.1.5.2. EAEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular.....	27
2.1.5.3. EAEC Enfeksiyonlarında Patojenite	28
2.1.6. Diyarejenik <i>E. coli</i> 'lerin Epidemiyolojisinde Gıda ve Suyun Önemi.....	29
2.2. <i>SALMONELLA</i>	31
2.2.1. <i>Salmonella</i> İzolasyonu ve Biyokimyasal Özellikleri	31
2.2.2. <i>Salmonella</i> 'larda Serotiplendirme.....	34
2.2.4. <i>Salmonella</i> ve Konak Adaptasyonu	36
2.2.5. <i>Salmonella</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi	36
2.2.5.1. <i>Salmonella</i> Türlerinin Ekstraselüler Ortamdan Konak Hücrelere Geçiş	39
2.2.5.2. Konak Hücrelerinde Kolonizasyon	40
2.2.5.3. Alternatif Sigma Faktörleri	42
2.2.5.4. Asit Tolerans Yanıtı	42
2.2.6. <i>Salmonella</i> Enfeksiyonlarında Oluşan Klinik Bulgular	43
2.2.6.1. Tifoid <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları	43
2.2.6.2. Non-Tifoid <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları	43

2.3. UÇUCU YAĞLAR VE ANTİMİKROBİYEL ÖZELLİKLERİ	43
2.3.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları.....	45
2.3.2. Zahter (<i>Thymbra spicata</i> L. Subsp. <i>spicata</i>) Uçucu Yağı.....	47
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	50
3.1. GEREÇ.....	50
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Standart Suşlar.....	50
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	50
3.1.2.1. Blood Agar (Merck 1.10886).....	50
3.1.2.2. Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)	51
3.1.2.3. Brain-Heart Broth (Merck 1.10493)	51
3.1.2.4. Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck1.12535).....	51
3.1.2.5. MacConkey Agar (Merck 1.05465)	52
3.1.2.6. XLD Agar (Merck 1.05287)	52
3.1.2.7. De Man Rogosa Sharp Agar (MRSA, Merck 1.10660).....	53
3.1.2.8. Baird Parker Agar (Merck 1.05406)	54
3.1.3. Sucuk Üretiminde Kullanılan Hammadde	55
3.2. YÖNTEM.....	55
3.2.1. Zahter Bitkisinin Temini ve İdentifikasyonu	55
3.2.2. Zahterin Uçucu Yağ Ekstraksiyonu ve Kimyasal kompozisyonunun Belirlenmesi	56
3.2.3. Zahter Uçucu Yağının Antimikrobiyel Etkinliğinin <i>in vitro</i> Ortamda Belirlenmesi	57
3.2.3.1. Antimikrobiyel Etkinliğin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi	57
3.2.3.2. Broth Mikrodilüsyon ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC Değeri) Belirlenmesi	57
3.2.5. Mikrobiyolojik Analizler	59
3.2.6. Sucuklarda Kimyasal Analizler.....	59
3.2.6.1. pH Değerinin Belirlenmesi	59
3.2.6.2. Kuru Madde Oranının Belirlenmesi.....	59

3.2.6.3. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Tayini.....	60
3.2.7. Organoleptik Analiz	60
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	60
4. BULGULAR.....	62
4.1. <i>Thymbra spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i> Uçucu Yağının Eldesi ve Hidrodistilasyon Verimliliği	62
4.2. Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Kompozisyonu	63
4.3. Uçucu Yağın <i>in vitro</i> Antimikrobiyel Etkinliği	65
4.4. Duyusal Analiz Sonuçları	66
4.5. Deneysel Sucuk Gruplarının Oluşturulması ve Sucukların Olgunlaşma ve Muhafaza Süresince Mikrobiyolojik Takibi	67
4.5.1. Sucuk Hamurlarının Başlangıç Yükleri	67
4.5.2. <i>E. coli</i> Sayısı	68
4.5.3. <i>Salmonella</i> Sayısı	70
4.5.4. Laktik Asit Bakterileri (LAB) Sayısı	72
4.5.5. Mikrokok-Stafilokok Sayısı	74
4.6. Deneysel Deneysel Sucuk Numunelerinde Olgunlaşma ve Muhafaza Süresince Meydana Gelen Kimyasal Değişimler	76
4.6.1. pH.....	76
4.6.2. Kuru Madde	76
4.6.3. Olgunlaşma Sonrası Sucuk Gruplarının TBA Değerleri.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
6. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ.....	129

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	<i>Escherichia coli</i> 'nin bazı karakteristik özellikleri	8
Tablo 2.	Yaygın olarak görülen ETEC fenotipleri	15
Tablo 3.	<i>Salmonella</i> 'nın bazı biyokimyasal özellikleri	32
Tablo 4.	<i>Salmonella</i> patojenite adalarının bazı özellikleri	38
Tablo 5.	SPA-1 gen bölgesi tarafından kodlanan efektör proteinler ve biyokimyasal aktiviteleri.....	40
Tablo 6.	Deneysel sucuk hamur karışımının bileşimi	55
Tablo 7.	Çalışmada oluşturulan deney grupları.....	58
Tablo 8.	Panelistler tarafından doldurulan sucuk duyu analizi formu	61
Tablo 9.	Çalışmada elde edilen uçucu yağ ekstraksiyon verimliliği	63
Tablo 10.	Çalışmada elde edilen <i>Thymbra spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i> uçucu yağının kimyasal kompozisyonu	64
Tablo 11.	Zahter uçucu yağının antimikrobiyel etkinliği	65
Tablo 12.	Olgunlaşma sonrasında sucuk gruplarının duyu analizi sonuçları.....	67
Tablo 13.	Sucuk hamurlarına ait başlangıç mikrobiyolojik analiz bulguları (log kob/g)	67
Tablo 14.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresince <i>E. coli</i> düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)	69
Tablo 15.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki <i>S. Typhimurium</i> düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)	71
Tablo 16.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki LAB düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)	73
Tablo 17.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki Mikrokok-Stafilokok düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)	75
Tablo 18.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki pH değerleri ve istatistik önemlilik dereceleri	77
Tablo 19.	Deneysel Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki KM değerleri (%) ve istatistik önemlilik dereceleri	77

Tablo 20. Olgunlaşma sonrası deneysel sucuk gruplarına ait TBA (mg malonaldehit/kg) değerleri.	78
--	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	EPEC patogenezi.	13
Şekil 2.	ETEC'in hücrel patogenezi.....	19
Şekil 3.	EIEC hücrel patogenezi	21
Şekil 4.	EAEC patogenezinin aşamaları	28
Şekil 5.	Esansiyel yağların mikroorganizmalar üzerindeki hedef bölgeleri ve antimikrobiyel etki mekanizmaları.....	45
Şekil 6.	<i>Thymra spicata</i> 'nın içerdği bazı uçucu yağların kimyasal yapıları.....	48
Şekil 7.	Uçucu yağ ekstraksiyonunda kullanılan cam Clevenger aparatı	56
Şekil 8.	Clevenger aparatı ve <i>Thymra spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i> uçucu yağı	62
Şekil 9.	<i>Thymra spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i> bitkisinin gaz kromatografik profili	63
Şekil 10.	<i>Thymra spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i> uçucu yağının <i>in vitro</i> antimikrobiyel etkinliği.....	66
Şekil 11.	Deneysel olarak üretilen sucuklarda <i>E. coli</i> düzeyleri	68
Şekil 12.	Deneysel olarak üretilen sucuklarda <i>Salmonella</i> düzeyi.....	70
Şekil 13.	Deneysel olarak üretilen sucuklarda LAB düzeyleri.....	72

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Et ve et ürünleri, insan vücudunun ihtiyaç duyduğu vitamin, mineral, iz element ve esansiyel aminoasitleri oldukça fazla içeren besinlerdendir (1, 2). Besin öğelerinin günlük olarak gıdalarla alınması; insanın büyümesi, gelişmesi, fiziksel performans sergilemesi, sağlıklı ve üretken olarak uzun süre yaşaması için gereklidir (3). Lezzet ve aromalarının yanısıra bitkisel proteinlere oranla sindirilebilirliklerinin yüksek olması ve besin öğelerini yeterli ve dengeli olarak içermeleri nedeniyle, et ve et ürünleri sağlıklı beslenmede oldukça önemli bir yere sahiptir (1, 4).

Eski çağlardan bu yana etin bozulmadan muhafaza edilme gereksinimi, çeşitli et ürünlerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Özellikle bozulmaya karşı dayanıklı olması amacıyla ete uygulanan bazı işlemler aynı zamanda ürüne kendine has lezzet ve aroma kazandırmış ve böylece günümüze kadar 1000'e yakın et ürünü ortaya çıkmıştır (4). Türkiye'de de çeşitli et ürünleri sıklıkla tüketilmekte, bunların içinde toplumun damak zevkine hitap eden sucuk, en çok üretilen ve tüketilen et ürünü olarak öne çıkmaktadır (5-7). Divanü Lugati't-Türk'te geçen sucuk terimi; koyun bağırsaklarına doldurulmuş et ve baharat karışımı olarak tanımlanmıştır (8).

Sucuk, kıyma makinasında veya kuterde kıyılmış et ve yağın, tuz, şeker, çeşitli baharatlar ve diğer katkı maddeleri ile karıştırıldıktan sonra doğal veya suni kılıflara doldurulması ve belirli ısı, nisbi rutubet ve hava akımında olgunlaştırılması ile üretilen fermente bir et ürünüdür (6).

Sucuk üretimi yapan işletmelerdeki yetersiz hijyen koşulları ve standart bir üretim yöntemi olmaması nedeniyle Türkiye'de tüketime sunulan sucukların istenen kimyasal ve mikrobiyolojik kaliteyi yakalayamadığı belirtilmektedir (6, 7, 9). Nüfus artışına paralel olarak gıda talebinin artması, gıda teknolojilerinde bazı hijyenik önlemlerin göz ardı edilmesine yol açmaktadır (9, 10). Dolayısıyla yapılan birçok araştırma, Türkiye'de

Üretilen ve satışa sunulan sucukların gıda kaynaklı hastalıklar açısından riskli olduğunu ortaya koymaktadır (6, 7, 9-12). Gıda kaynaklı hastalık risklerinin ortadan kaldırılması amacıyla sucuk benzeri et ürünlerine sıklıkla tuz, nitrat, nitrit, nisin ve starter kültür eklenmektedir (13). Ayrıca bu ürünlerin yapımında bazı antimikrobiyel etkili maddelerin kullanıldığı çeşitli deneysel çalışmalar da yapılmıştır (14-16).

Lamiaceae ailesine ait bitki türleri Türkiye’de benzer kokularından dolayı kekik olarak adlandırılmaktadır. *Thymus*, *Satureja*, *Coridothymus* ve zahter olarak bilinen *Thymbra* cinsi bu ailenin bilinen türleridir. Yüksek miktarda fenolik bileşik içermelerinden dolayı kekik türlerinin antibakteriyel, antispazmodik ve antiseptik etkili oldukları bilinmektedir (17). Bu tür bitkilerin ortak özellikleri, uçucu yağ ana bileşenlerinin genellikle karvakrol ve timolden oluşmasıdır (18). Zahter, farklı amaçlar için taze veya kurutulmuş olarak tktilebildiği gibi uçucu yağı çıkarılarak da kullanılmaktadır. Gıdalara aroma verici olarak katılmasının yanı sıra sabun ve şampuan yapımında ve tıbbi amaçla da kullanılabilmektedir (19, 20). Türkiye’de zahterin tüketimi, çoğunlukla toplandığı yörede ve dolayısıyla iç piyasada yapılmaktadır (21, 22). Antimikrobiyel etkinliği bilinen ve Türkiye florasında yaygın olarak bulunan zahterin sucuklarda meydana gelebilecek olası mikrobiyel kontaminasyonları ve sağlık risklerini minimize edebileceği tahmin edilmektedir.

Günümüzde tkticiler, gıdaların besin değeri açısından zengin olmasını ve kimyasal koruyucu ya da kalıntı içermeksizin, doğal yollarla korunmasını talep etmektedirler (23). Bu talepler dikkate alındığında insan gıdası olarak tktilebilen çeşitli bitki ve bitkisel ekstraktların antimikrobiyel etkinlik amacıyla sucuklara katılması, halk sağlığının korunması ve tktici taleplerinin karşılanması açısından uygun bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada herhangi bir kimyasal taşıyıcı kullanılmadan zahterden elde edilen uçucu yağın, fermente sucuk üretiminde kullanılabılme imkanları, gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesi ve ürünün kimyasal ve duyuusal özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Doğal bileşenlerin gıda teknolojilerinde kullanılma denemeleri, gıdaların güvenli bir şekilde tkticiye ulaştırılması açısından manidar bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Dengeli beslenme, bireyin yaşamsal faaliyetlerini sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesi için önemli bir faktördür. Bu nedenle yetişkin bir bireyin her bir kg canlı ağırlık için günde 0.8 g protein tüketmesi ve organizmanın yapıtaşını oluşturan aminoasitleri yeterli ve dengeli miktarlarda alabilmesi için bu miktarın en az üçte birinin hayvansal proteinlerden oluşması gerekmektedir (24). Türkiye’de artan sucuk üretimi, sucuğun önemli bir hayvansal protein kaynağı olduğunu göstermektedir (25).

Dünyada her birey, fiziksel ve mental gelişimini sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmek için sağlıklı gıdaya ulaşma hakkına sahiptir (26). Güvenli ve yeterli gıda üretiminin ve bu gıdaların sağlıklı ve kaliteli olarak tüketiciye ulaştırılmasının halk sağlığı açısından önemi vurgulanmaktadır (26, 27). Et ve et ürünleri, hayvansal gıdalardan geçebilen zoonoz hastalıklar açısından ciddi riskler oluşturabilmektedir (28). İnsanlarda görülen hastalıkların yaklaşık %60’nın zoonoz olduğu; %90’ının ise hayvansal gıdalardan kaynaklandığı bilinmektedir (29). Her yıl yaklaşık 1.8 milyon çocuğun gıda kaynaklı hastalıklardan öldüğü rapor edilmektedir (30-32). Avrupa’da ortaya çıkan BSE ve dioksin krizleri ve aynı dönemlerde Amerika Birleşik Devleti (ABD)’nde kırmızı etlerde *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarına bağlı ölüm vakaları sonucu “sağlıklı gıda” tanımı dünya çapında yeniden dizayn edilmiş; FAO/WHO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü) Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından gıda hijyeni, “Sağlıklı ve kusursuz gıda üretimini sağlamak amacıyla gıdaların üretim, işleme, muhafaza ve dağıtımları sırasında gerekli kurallara uyulması ve önlemlerin alınması” olarak tekrar tanımlamıştır (26). Bu çerçevede geleneksel yarı kuru fermente Türk tipi sucukların güvenli olarak üretilip tüketiciye sunulması oldukça önem taşımaktadır.

İlk çağlardan bu yana, etin uzun süre muhafazası için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Kurutma, tuzlama, çemenleme, dumanlama, fermentasyon gibi fiziksel ve kimyasal uygulamalarla etlerin muhafaza süresi uzatılabilmektedir (33-35). Etin muhafaza

süresini uzatmak için yapılan her işlem, ürüne özgü organoleptik özelliklere katkıda bulunarak farklı ürünlerin oluşmasına sebep olmuştur. Tarih boyunca Türklerin yaşadığı Anadolu, Balkanlar, Orta Asya, Kafkaslar, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da sevilerek tüketilen önemli bir et ürünü olan sucuktan M.Ö. 500'de yazılmış, bilinen en eski yemek kitabı olan *Deipnosophists*'de de bahsedilmektedir (36-38). Toplum talepleri ve bölgesel damak zevkleri gibi nedenlerle Türkiye'de farklı formülasyonlar ile sucuk üretilmektedir (1, 39, 40).

Türk Gıda Kodeksinde, fermente sucuk; büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı %40 ve altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtılmış işlem uygulanmamış fermente et ürünü olarak tanımlanmaktadır. Isıtılmış işlem görmüş sucuk ise büyükbaş ve/veya küçükbaş hayvan etlerinin ve yağlarının veya kanatlı hayvan etleri ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı %50'nin altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtılmış işlem uygulanmış et ürünü olarak tanımlanmaktadır (41).

Türk tipi sucuk, %40-45 nem oranı ile yarı kuru fermente et ürünü olarak sınıflandırılmaktadır (35). Türk Standartları Enstitüsü'ne (42) göre Türk sucuğunun nem oranı en çok %40; pH değeri 5.4-5.8 aralığında olmalıdır. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliğine (41) göre ise nem miktarı en çok %50; pH değeri fermente sucuklarda en çok 5.4, ısıtılmış işlem görmüş sucuklarda ise en çok 5.6 olmalıdır.

Ülkemizde geleneksel fermente sucuk ve ısıtılmış işlem görmüş sucuk olmak üzere iki tip sucuk üretilmektedir. Geleneksel fermente Türk sucuğunun üretimi, ısıtılmış işlem görmüş sucukların ticari olarak daha avantajlı olması nedeniyle azalmaktadır. Ancak, fermente sucuğa oranla üretimi daha kolay ve daha kısa sürede gerçekleştirilen ısıtılmış işlem görmüş sucuk, duyu nitelik bakımından geleneksel fermente sucuğun gerisinde kalmaktadır. Günümüz Türkiye'sinin modern ticari işletmelerinde, sucuk üretim miktarı giderek artmakta, fermentasyon işlemi; bağıl nem, sıcaklık ve hava akımının kontrol edildiği özel kabinlerde gerçekleştirilmektedir (8, 43).

Fermentasyon, et ürünlerinin muhafaza süresini uzatmak ve ürüne farklı organoleptik özellikler kazandırmak amacıyla çok eski zamanlardan beri kullanılan bir yöntemdir (44). Çeşitli mikroorganizmaların enzimatik faaliyetleri sonucu protein, yağ ve karbonhidratların parçalanması ile ortaya çıkan lipid, peptid, serbest yağ asitleri ve indirgen şekerler gibi bileşikler, gıdaya çeşitli duyuşal özellikler kazandırmaktadır (45). Sucuklarda fermentasyon, etin doğal ve kontamine mikrobiyel yükü, üretim hattına bulaşan mikroorganizmalar ve/veya starter kültür ilavesi ile sağlanmaktadır. Sucuk üretiminde starter kültür; fermentasyon sürecini kontrol altında tutmak, olgunlaşma süresini kısaltmak, ürünün stabilitesini sağlamak, istenen organoleptik özellikleri kazandırmak, standart ürün üretimini garanti altına almak ve intestinal biota üzerine düzenleyici etki sağlamak gibi amaçlar için kullanılmaktadır (46, 47). Geleneksel yarı kuru fermente Türk sucuklarında fermentasyondan *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei* ve *L. brevis* gibi laktik asit bakterilerinin yanısıra *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* ve *Micrococcus* spp. gibi mikroorganizmalar sorumludurlar (48, 49). Starter kültürler, gıda biotasına hakim olmak suretiyle lezzet ve tekstür gibi organoleptik özelliklerin gelişmesine katkı sağlarken, patojenleri ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaları da baskılamaktadırlar (50, 51). Kontollü fermentasyonda, sucuk hamuruna 10^7 kob/g düzeyinde starter kültür katılarak 10-38 °C’de 12-48 saatte fermentasyon tamamlanmaktadır (49, 50, 52, 53). Starter kültür kullanılmadan üretilen sucuklarda, doğal biotanın değişkenliği nedeniyle, üretimde standardizasyonu sağlamak oldukça zordur (50). Sucuk yapımında, çeşitli starter kültür kombinasyonlarının kullanıldığı bir çalışmada starter kültür katılmış fermente Türk sucuklarının duyuşal ve kimyasal özelliklerinin daha üstün olduğu, starter kültür kombinasyonlarının uygulandığı tüm sucuk gruplarının kontrol gruplarından daha çok beğenildiği ortaya konmuştur (13).

Son zamanlarda ticari avantajları dolayısıyla üretimi piyasaya hakim olan ısıl işlem görmüş sucukların üretiminde, sucuk hamurunun su aktivitesi ve pH’sına göre, merkez sıcaklığı 68-72 °C olacak şekilde ısı işlemi uygulanmaktadır. Bu işlemin hemen ardından merkez sıcaklığı hızla 5 °C’ye düşürülerek direk satışa sunulmaktadır. Isıl işlem ile nem oranı düşen ürün daha sıkı ve sert bir hal almakta, enzim içeriği de inaktif hale getirilerek acılaşmanın önüne geçilmektedir. Ayrıca ısı işlemi ile birçok patojen ve saprofit bakteriler yıkımlanarak ürünün raf ömrü arttırılmaktadır (1). Fakat bu gibi

avantajların yanında ısı işlemi ile geleneksel Türk tipi fermente sucuklarda arzu edilen organoleptik özelliklerden sorumlu bazı mikroorganizmalar da yıkımlanmaktadır. Yine ısı işlem uygulamaları sonucu, ürüne kendi özelliğini kazandıran laktik asit oluşumu, lipoliz, proteoliz ve oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlar istenilen düzeyde şekillenmemektedir (45). Dolayısıyla son ürün, sevilen sucuk özelliklerinin tamamına sahip olamamaktadır (54). Ancak son zamanlarda ürünün organoleptik kalitesini arttırmak amacıyla dolumu takiben 25-35 °C’lerde 24 saat veya daha kısa süreler bekletilerek kısmi bir fermentasyon sürecinden sonra ısı işlemi uygulanmaktadır (1).

Kesimden sonra etin başlangıç mikrobiyel yükünün büyük bir kısmını oluşturan *Pseudomonas* ve Enterobacteriaceae ailesine ait türler, sucuk hamurunda da baskın hale gelmektedir. Ancak starter kültür ilavesi ile ortamdaki hakimiyetlerini fermentasyonda rol alan *Lactobacillus* gibi mikroorganizmalara bırakmaktadır (55). Kontamine hammadde kullanımı, uygun olmayan üretim koşulları ve çevresel kontaminasyonlar nedeniyle tüketime sunulması planlanan sucuklar, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, Koagülaz pozitif Stafilokok ve sülfite indirgeyen anaeroblar açısından halk sağlığını tehdit edebilmektedir (5, 12, 55-57).

Türkiye’de et ürünleri endüstrisi gelişmeye devam ederken günümüzde küçük ve orta ölçekli yarı profesyonel işletmeler de varlıklarını sürdürmektedir. Bu tip işletmelerde üretim geleneksel yöntemlerle yapıldığından, üründe mikrobiyolojik bozulma söz konusu olabilmekte ve üretilen sucuklarda standardizasyon eksikliği göze çarpmaktadır (35). Et ve et ürünleri patojen mikroorganizmaların gelişme ve çoğalabilmeleri için optimum bir ortamdır (39). Bu nedenle sucuğun olası mikrobiyel tehlikeler minimize edilerek tüketiciye sunulabilmesi oldukça önemlidir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (58) kapsamında fermente sucuklar için belirlenen kriterlerde *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 ve *Salmonella* spp. için sıfır tolerans politikası uygulanmaktadır.

Türkiye’de üretilen sucukların mikrobiyolojik kalitesini konu alan birçok araştırmada, sucukların *E. coli* ve *Salmonella* spp. gibi tehlikeleri sıklıkla bulundurduğu ortaya konmuştur. Örneğin, yapılan bir çalışmada (59) toplam 18 sucuk örneğinin % 39’unun *E. coli* ile kontamine olduğu bildirilmiş, bir başka çalışmada ise incelenen 60 sucuk numunesinden 9’unun *E. coli*, birinin de *Salmonella* spp. pozitif olduğu ortaya

konmuştur (60). Kök ve ark. (61) tarafından yapılan bir çalışmada, incelenen numunelerin %16'sının *E. coli*, %5'inin ise *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu bildirilirken, Konya'da yapılan bir çalışmada (62), 15 sucuk örneğinin tamamında *E. coli* saptandığı rapor edilmiştir. Sancak ve ark. (9) ise inceledikleri numunelerin %64'ünün *E. coli* ile kontamine olduğunu ortaya koymuşlardır. Ertaş ve ark. (12) tarafından incelenen 100 sucuk örneğinin %4'ünde *Salmonella* spp. tespit edilmiştir. Özbey ve ark. (63) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 100 sucuk örneğinden %7'sinin *Salmonella* spp. pozitif olduğu rapor edilmiştir. Öksüztepe ve ark. (7) tarafından yapılan bir araştırmada, fermente sucukların sırasıyla %15 ve %3'ünün *E. coli* ve *Salmonella* spp. barındırdığı bildirilmiştir. Fermente sucuğun güvenilirliği ile ilgili ciddi sorunlara neden olan *E. coli* O157:H7'nin, Washington'da 20, California'da 3 yetişkin ve 2 çocuğun hemolitik üremik sendromu teşhisiyle hastaneye kaldırılmasından sorumlu tutulduğu rapor edilmiştir (64). Bahsedilen çalışmaların ışığında Türkiye'de sıklıkla tüketilen sucuğun, *E. coli* ve *Salmonella* açısından ciddi tehlike taşıdığı görülmektedir. Bu gibi tehlikelerin minimize edilebilmesi amacıyla doğallığı konusunda şüphe duyulmayan bitkisel ekstraktların gıda üretiminde kullanımı faydalı bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

2.1. *ESCHERICHIA COLI*

Sıcakkanlı canlıların intestinal biotasında oldukça geniş bir dağılım gösteren *Escherichia coli*, 1885 yılında pediatrist Dr. Theodore Escherich tarafından bulunmuş ve ilk olarak *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilmiştir (65, 66).

İnsan bağırsağında predominant olarak varlığını sürdüren *E. coli*, Gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteridir (67). *E. coli*'nin enterik hastalıklara sebep olabilme ihtimali, söz konusu bakterinin insan intestinal kanalında geniş dağılım göstermesi ve konak ile kommensal bir ilişki yürütmesi gibi sebeplerle uzun süre göz ardı edilmiştir. Ancak diyare ile seyreden hastalıkların etiyolojisinin belirlenmesinde serolojik karakterizasyon metodlarının kullanılması, *E. coli*'nin zararsız kommensal serotiplerinin yanı sıra patojen serotiplerinin de olduğunu ortaya koymuştur (65). *E. coli*'nin bazı karakteristik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir (68).

Tablo 1. *Escherichia coli* 'nin bazı karakteristik özellikleri

Özellik	Reaksiyon
Gram	-
Aerobik üreme	+
Anaerobik üreme	+
Optimum üreme sıcaklığı	37 °C
Katalaz	+
Oksidaz	-
D-Mannitol fermentasyonu	≥%90 +
Laktoz 37 °C ve 44 °C	≥%90 +
D-Adonitol	≥%90 -
D-Glukoz	Asit üretimi
İndol 37 °C	≥%90 +
İndol 44 °C	≥%90 +
Metil Red	≥%90 +
Voges-Proskauer	≥%90 -
Üreaz	≥%90 -
Fenilalanin deaminasyonu	≥%90 -
Lizin dekarboksilaz	%76-89 izolat +
H ₂ S	≥%90 -
Jelatin likefaksiyonu	≥%90 -

+: Pozitif reaksiyon; -:Negatif reaksiyon

E. coli'nin insan için patojen olan türleri; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere 4 kategoride incelenmektedir. Her bir kategori içinde yer alan farklı suşlar, genellikle plazmidler tarafından kodlanan spesifik virulens faktörlerin sebep olduğu patofizyolojik mekanizmalar ile benzer epidemiyolojide ve klinik seyirde hastalık oluşturmaktadır. Bu dört gruba, Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve Diffüz adherent *E. coli* (DAEC) olmak üzere iki farklı kategori de dahil edilerek son zamanlarda altılı bir sınıflandırma yapılmaktadır. EAEC grup *E. coli* serotipleri, ilk 4 gruptan tam olarak ayrılabilen tipik özelliklere sahip olmasa da kendine has aderenz fenotipine sahip olmaları bakımından farklılık göstermektedirler. Benzer şekilde DAEC

grubunda yer alan serotiplerde gözlenen patofizyolojik mekanizmalar, bunların ayrı bir grupta değerlendirmeye alınmasına sebep olmuştur (66, 69).

2.1.1. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

İntestinal biotada yer alan *E.coli*'ye ait bazı serotiplerin hastalık oluşturabilme ihtimalini göz önünde bulunduran Neter ve ark. (1955), çeşitli yaşlardaki çocuklarda görülen diyarelerden enteropatojenik *E. coli*'nin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir (70). EPEC grup serotiplerin patofizyolojilerinde toksin üretimi ve invazyon olmaması, sırasıyla bu özellikleri taşıyan ETEC ve EIEC gruplarının identifiye edilmesinde belirleyici bir rol oynamıştır. Levine ve ark. (71) tarafından farklı *E. coli* serotiplerinin diyare oluşturma mekanizmalarındaki farklılıkların belirlenmesi ile *E. coli* kaynaklı intestinal hastalıkların moleküler patogenezi daha iyi anlaşılmıştır.

E. coli serotiplerinin ayırımında kullanılan en önemli verilerden biri, somatik O antijenleridir. Bu serogrup tabanlı tanımlama, flagellar farklılıkları ifade eden H antijeni ile birlikte, *E. coli*'lerin ayırımında güncel olarak kullanılmaktadır. *E. coli* serotiplerinin gruplandırılmasında O:H tiplendirme sisteminin yanı sıra, intestinal kanalda neden oldukları patolojik değişiklikler de esas alınmaktadır (72).

2.1.1.1. Enteropatojenik *E. coli*'lerin Serogrupları

Enteropatojenik *E. coli*'ler bağırsak lümeninde spesifik histopatolojik değişikliklereneden olmaktadırlar. Tutundukları yüzeylerin düzleşmesi ve bağırsak villilerinin yok olması (Attaching-effacing; A/E) gibi lezyonlar oluşturmaktadır. A/E lezyonları, oluşturdukları hastalığın klinik seyrini de değiştirmektedir. Enteropatojenik *E. coli*'lerin en belirgin özelliklerinden bir tanesi de Shiga toksin (Stx) üretememeleridir (73).

EPEC grubuna örnek olarak, O18ab, O18ac, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142 ve O158 serotipleri verilmektedir (74, 75). H antijeni kullanılarak gerçekleştirilen serogruplandırma, aynı O antijenine sahip serotiplerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin, sağlıklı bireylerin intestinal biotasında bulunan O86'nın bilinen 21 serotipi içinde olan O86:H34'ün çocuklarda diyare etkeni olduğu ortaya konmuştur (76). Bunun yanı sıra O55 gibi bazı

serotipler sağlıklı bireylerin intestinal biotasında nadiren bulunmaktadır. Bu sebeple sadece O antijeni patojenik karakter için belirleyici bir kriter olmayıp, diğer antijenik determinantların da değerlendirilmesi gerekmektedir (77).

2.1.1.2. EPEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular

EPEC enfeksiyonları, karakteristik klinik bir bulguya sahip değildir. Ancak tipik olarak bu enfeksiyonlarda sulu ishal, yüksek olmayan ateş ve kusma gözlenmektedir (71, 78). Özellikle şiddetli durumlarda 14 günden fazla süren inatçı diyare şekillenebilmektedir (78, 79). Gastroenteritisli çocukların incelendiği bir çalışmada (80), EPEC pozitif çocuklarda ortalama 4.6 gün süren diyare tablosu dikkat çekerken, bakteriyel olmayan vakalarda diyarenin ortalama 2.4 gün sürdüğü belirlenmiştir. Bu bulgunun ışığında, EPEC'in potansiyel olarak Rotavirus gibi pediatrik diyare etkenlerinden daha şiddetli bir klinik tabloya yol açabileceği ortaya konmuştur. Bir yaşını geçmiş çocuklarda ve yetişkinlerde semptomatik olarak EPEC enfeksiyonlarına rastlanmıyor olması, bu etkene karşı bağışıklık geliştirdiğini göstermektedir. Özellikle EPEC insidensinin yüksek olduğu coğrafi bölgelere seyahat eden bireylerin EPEC enfeksiyon tablosu göstermemesi kazanılmış bağışıklık ile ilişkilendirilmektedir (80).

2.1.1.3. EPEC Epidemiyolojisi

EPEC, dünya genelinde sıklıkla iki yaşının altındaki çocuklarda diyareye sebep olan bir etkidir (80-82). Vaka kontrol çalışmalarında, altı aydan küçük çocuk diyarelerinden EPEC izolasyon oranının oldukça yüksek olduğu ortaya konmuştur (83). Hem kolostrum hem de anne sütünün, EPEC grup bakterilerin HEp-2 (Human epithelial type 2) hücrelerine tutunmasını engelleyen spesifik ve nonspesifik faktörler içerdiği belirlenmiştir. Bu sebeple bebeklerin yeterli anne sütü almamasının EPEC açısından risk oluşturabileceği düşünülmektedir (84).

Avrupa ve Kuzey Amerika'da 1950'lerde patlak veren EPEC salgınlarında, infantlarda %50'ye varan ölümler rapor edilmiş, ancak bebek bakım ünitelerinin hijyen ve sanitasyonunun geliştirilmesi ile EPEC sebepli ölümler neredeyse ortadan kalkmıştır. Günümüzde sıklıkla günlük bakım üniteleri ve kreşlerde bulunan çocuklarda sporadik

olarak diyarelere rastlanmaktadır. Ayrıca nadir de olsa yetişkinlerde de bazı EPEC salgınları rapor edilmiştir (85).

EPEC, gelişmiş ülkelerden ziyade, gelişmekte olan ülkelerde risk oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde bir yaşın altındaki bebeklerde şekillenen diyarelerin çoğunlukla Rotavirus ve EPEC kaynaklı olduğunu bildirmektedir (86). EPEC kaynaklı diyare tespit edilen bebeklerin bulunduğu fiziksel çevrede de (bebek elbiseleri, oyuncaklar, bebek arabaları, banyo ortamları, toz) EPEC kontaminasyonu belirlenmiştir. Fekal-oral yol, kontamine mamalar, iyi muhafaza edilmemiş besinler, bebek bakıcılarının personel hijyeni ve bebeklerin temas ettiği kontamine cisimler bulaşmada önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bu hastalık etkenlerinin solunum yoluyla da alınabileceği kabul edilmektedir (86).

2.1.1.4. EPEC İzolasyon ve İdentifikasyonu

EPEC ve diğer tüm *E. coli* serogrupları benzer koloni morfolojisi sergilemekte ve biyokimyasal reaksiyon vermektedir. Herhangi bir klinik laboratuvarında EPEC ve diğer *E.coli*'lerin identifiye edilmesi mümkün olmayabilmektedir. *E. coli* olarak tanımlanan izolatların serogruplandırılması ve serotiplendirilmesi, yoğun iş yükü ve profesyonel yaklaşım isteyen pahalı işlemlerdir (87).

EPEC'in belirlenmesinde temel olarak suşların epitel dokuya tutunma karakteristiği ve Shiga toksin oluşturmaması baz alınmaktadır. EPEC suşlarının tanımlanmasında fenotipik ve genotipik identifikasyon teknikleri etkin olarak kullanılmaktadır. Fenotipik karakterlerin diğer serogruplar ile karışma olasılığı olduğundan, günümüzde genotipik identifikasyon çok daha yoğun olarak tercih edilmektedir. EPEC suşlarının fenotipik identifikasyonunda A/E etkinlikleri, Floresan Aktin Boyama (FAS) tekniği ile belirlenmektedir (88, 89). Genotipik identifikasyonda ise PCR bazlı moleküler teknikler kullanılmaktadır. PCR analizinde enterositlerin yıkılmasından sorumlu genlerin (Enterocyte effacement locus; LEE) bulunduğu patojenite adasında, *eae* (attaching and effacing) geninin var olup olmadığı araştırılmaktadır. EPEC suşlarının HEp-2 hücrelerine tutunmasında bu gen ve EAF (EPEC Adherenz Factor) plazmidi önemli rol oynamaktadır. Plazmid bulunmayan durumlarda; Shiga toksin üretimi yoksa ve A/E fenotipini gösteriyorsa suş, atipik EPEC olarak kabul edilmektedir (90-92).

2.1.1.5. EPEC Enfeksiyonlarında Patojenite

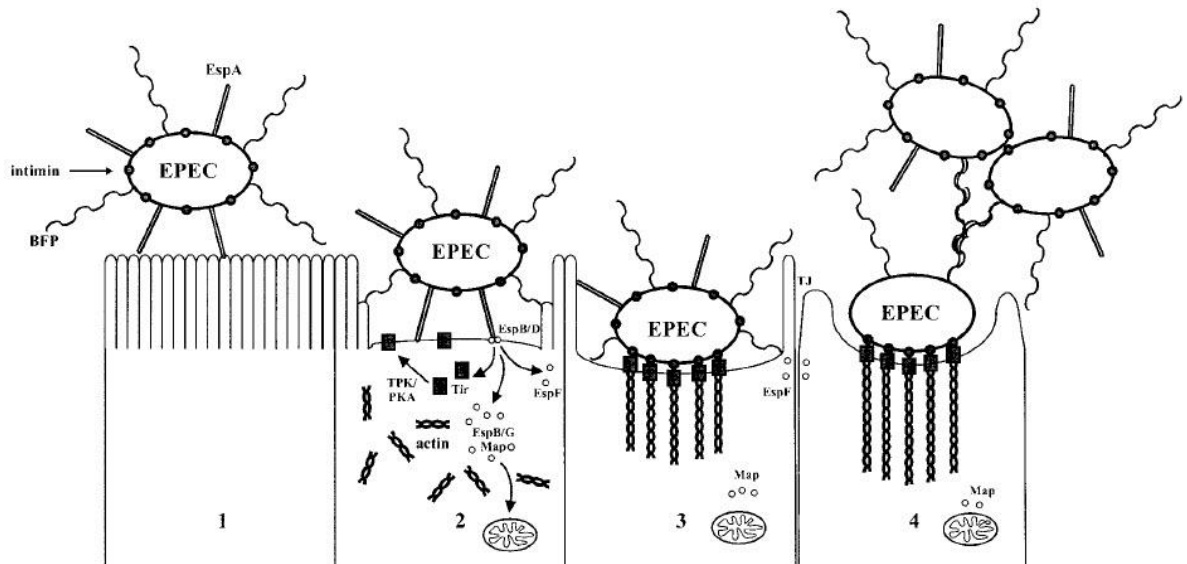
EPEC enfeksiyonlarının histopatolojik tablosunu ilk kez Polotsky ve ark. 1977 yılında bildirmişlerdir (93). Etkenin intestinal lümende ilk olarak epitel dokuya tutunduğu ve çoğaldıktan sonra tutunduğu bağırsak villuslarını yok ettiği rapor edilmektedir. Bu tutunma ve dejenerasyon sonucunda enterositlerde emilim gerçekleşmemekte ve sulu bir diyare gözlemlenmektedir. Ayrıca Knutton ve ark. (88) EPEC'in bağırsak villuslarına tutunduğu bölgede aktin birikimi olduğunu ve bu birikimin enterosit yıkımlanmasında aktif rol oynadığını belirlemişlerdir.

Moleküler analizlerde, A/E lezyonlarının şekillenmesinde rol oynayan ve 35 kb kromozomal LEE gen bölgesi hedef alınmaktadır (92). Bu gen bölgesinde, bakterinin hücreye tutunmasını sağlayan ve tutunduğu hücredeki sinyalizasyon mekanizmalarını etkileyen çeşitli proteinler de (espA, B, D) kodlanmaktadır (94). LEE gen bölgesi, *eae* genini de içermektedir. EPEC suşları, bu gen sekansı ile kodlanan ve dış membran proteini olan "intimin" sayesinde, tutunma ve villilerde yıkımlanmaya neden olmaktadır. Yaklaşık olarak 94 kb olan bu protein, konakçı hücre yüzeyine tutunmayı sağlamaktadır. İntimin, *Yersinia* invazin proteini ile %50 benzerlik göstermektedir (95). Sekans ve antijenik farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda yaklaşık 17 farklı intimin olduğu belirtilmektedir (96).

EPEC suşlarının bir diğer önemli özelliği de *in vitro* epitel hücre hattında lokalize olarak mikrokoloniler oluşturmalarıdır (97). EPEC'ler bu özellikleri sayesinde diğer diffuz adherenz *E. coli* serogruplarından ayırt edilmektedir. EPEC'lerin bu özellikleri EAF adı verilen 55-70 megadalton (MDa) ağırlığında bir plazmid sayesinde kazanılmıştır. Mikrokoloni oluşumunda bakterilerin bakterilere tutunması BFP (Bundle-forming pilus) mekanizması ile gerçekleşmektedir. Ancak BFP'nin epitel hücreye tutunmada yardımcı olup olmadığı henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (98).

DNA dizi analizi genellikle, adherenz mekanizmasını düzenleyen pMAR2 plazmidi hedef alınarak yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada (99), pMAR2 plazmidi inhibe edilmiş EPEC suşlarının adherenz özelliklerinin kaybolduğu, adherenz özelliği göstermeyen *E. coli* P678-54 ve HB101 suşlarında ise plazmid indüklendiğinde, adherenz özellik kazandıkları rapor edilmiştir. Ayrıca EAF bazlı DNA problemleri da son

zamanlarda EPEC karakterizasyonu ve epidemiyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (100). Özetle EPEC enfeksiyonunun gelişimi 4 temel adımda şekillenmektedir: (I) BFP, intimin ve yüzey ilişkili filamentler (EspA) gibi spesifik proteinlerin kromozomal ve plazmid DNA'dan eksprese edilmesi; (II) BFP ve EspA proteinleri aracılığıyla enterosit mikrovillilerine bakteriyel tutunmanın gerçekleşmesi; (III) BFP flamenletinin bağlanmasından sonra intimin etkinliği ile tutunmanın tamam olarak sağlanması (bu aşamada aynı zamanda hücre yüzeyinin altında aktin ve diğer hücreiskeleti elemanları birikimi gözlenir); (IV) bakterilerin birbirine tutunarak mikrokoloni oluşturmaları ve mikrovillusların aktin ve diğer proteinlerin yoğun birikiminden dolayı çalışamaz hale gelmesi/yıkımlanması (101). Belirtilen üçüncü adımın gerçekleşmesi için çeşitli proteinler sentezlenmektedir. Bu proteinler, sinyal iletimine yardımcı olmak, hücre kalsiyum seviyesini arttırmak ve tutunma bölgesinin hemen altında hücre iskeletini oluşturan aktin ve benzeri proteinlerin birikimini sağlamakla görevlidir. Bu üç aşamanın tamamında kromozomal genler ve plazmidler etkin olarak görev almaktadır (101). Epec patogenezi Şekil 1'de detaylı olarak verilmektedir (101).



Şekil 1. EPEC patogenezi. (I) BFP, intimin ve yüzey ilişkili filamentler (EspA) gibi spesifik proteinlerin ekspresyonu, (II) BFP ve EspA proteinleri aracılığıyla enterosit mikrovillilerine tutunma, (III) İntimin tutunması ve bölgede hücrese aktin ve diğer hücre iskeleti elemanları birikimi, (IV) bakterilerin mikrokoloni oluşturmaları ve mikrovillusların çalışamaz hale gelmesi/yıkımlanması

2.1.2. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *E. coli* adından da anlaşılacağı üzere temel olarak toksin sentezi ile hastalık oluşturan bir patogenezi sergilemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde infant diyare etkeni olarak da dikkati çeken ETEC, “Seyahat Hastalığı” olarak bilinmektedir (102-106). ETEC’in tanımlanması ve hastalığın seyrinin belirlenmesi, 1960’larda enterotoksinlerin keşfedilmesi ile mümkün olmuştur. Smith ve Gyles (1970) tarafından, *E. coli* enterotoksinlerinin; ısı labil toksin (LT) ve ısı stabil toksin (ST) olmak üzere ikiye ayrıldığı rapor edilmiştir (107). Enterotoksijenik *E. coli*’lerin bazı suşları her iki toksini de sentezleyebilmektedir. Ancak ETEC’lerin patojenitelerinde sadece enterotoksin üretimi değil aynı zamanda “Kolonizasyon Faktör Antijeni (CFA)” adı verilen insan ince bağırsaklarına tutunma faktörleri de önemli rol oynamaktadır (108).

2.1.2.1. Enterotoksijenik *E. coli*’lerin Serogrupları

ETEC’in O serogrubuna ait 75’in üzerinde *E. coli* serotipi ihtiva ettiği bilinmektedir. Ancak bu suşların neredeyse yarısı sadece bir defa tespit edilebilmiştir. Bu gruba ait en yaygın serotipler; O6, O8, O25, O27, O78, O128, O153, O148 ve O159’dur (109). O serotiplendirmesi, ETEC’lerin tanımlanmasına yaygın olarak kullanılan etkili bir yöntemdir. Ancak ETEC O serogrupları genellikle üriner sistem enfeksiyonlarına ya da meningitise sebep olan nontoksijenik *E.coli*’lerle karışabilmektedir. Bu sebeple H serotiplendirmesi bu grupta da önem kazanmaktadır. ETEC serogrubunda 30’un üzerinde farklı H serotipi identifiye edilmiştir. Bunlardan en yaygın olanları; H9, H12, H21 ve H45’dir. H serotiplendirilmesi etkili olarak kullanılmasına rağmen ETEC patogeneziinde flagellanın fonksiyonu tam olarak ortaya konamamıştır (110). Yaygın olarak görülen ETEC fenotipleri Tablo 2’de detaylı olarak gösterilmektedir (86).

Tablo 2. Yaygın olarak görülen ETEC fenotipleri

Serotip	Toksin	CFA
O6:H16	LTST	CFA/II (CSI ve CS3 ya da CS2 ve CS3)
O8:H9	LTST	CFA/II (Sadece CS3)
O8:H9	LT	CS17
O27:H7	ST	CFA/IV (Sadece CS6)
O78:H12	ST ya da LTST	CFA/I
O128:H12	LTST	CFA/I
O148:H28	ST	CFA/IV (Sadece CS6)
O153:H45	ST	CFA/I
O169:H-	ST	CFA/IV (Sadece CS6)

CFA: Kolonizasyon Faktör Antijeni, CS: Coli Yüzey Antijeni

Tutunma faktörü olarak bilinen kolonizasyon faktör antijeni (CFA), O ve H antijenleri ile birlikte üçüncü bir serotiplendirme enstrumanı olarak değerlendirilmektedir. CFA/I, CFA/II ve CFA/IV en yaygın olarak belirlenen faktörlerdir (109). Ancak ETEC serotiplerinin %30'undan azında bu antijenik determinantlar tespit edilmiştir (111, 112). CFA aynı zamanda Coli yüzey antijeni (CS) adı verilen bir alt determinant bulundurmaktadır. Ancak terminolojik olarak bu yüzey antijenlerinin belirlenmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir. Ayrıca CFA gibi determinantların moleküler olarak incelendiği daha kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır (111).

ETEC'in yaygın O ve H serogrupları ve CFA determinantlarına gelişmekte olan ülkelerde daha sık rastlanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yaşayan bireylerde ETEC'e karşı aktif bir bağışıklık olmadığından, gıda ve su kaynaklı ETEC salgınları gelişmekte olan ülkelere oranla daha fazla gözlenebilmektedir (86).

2.1.2.2. ETEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular

ETEC enfeksiyonlarında karakteristik olarak mide bulantısı, abdominal kramp ve orta derecede ateş ile seyreden yangısal olmayan bir diyare gözlenmektedir. ETEC alımını takiben 1-3 gün içinde başlayan diyarede hemoraji yoktur. ETEC klinik tablosu, *Vibrio cholerae* enfeksiyonlarına oldukça benzemektedir. Ancak kolerada ileri derecede bir dehidrasyon ve yüksek mortalite bildirilmektedir (113).

Hastalığın seyri hangi serotipin alındığı ile ilgili olarak değişkenlik göstermektedir. Sporadik rastlanan seyahat hastalığı vakalarında hastalık orta dereceli seyreterek bir hafta içinde iyileşmektedir (114). Hastalık tablosu, dehidrasyona hassasiyetlerinden

dolayı çocuklarda daha şiddetlidir. Doğru tedavi uygulanmadığı takdirde malnutrasyona kadar varabilen tablolar gözlenebilmektedir. Semptomatik veya asemptomatik fekal saçılım, kötü hijyen koşullarında hastalığın yayılımını arttırmaktadır (113).

2.1.2.3. ETEC'in Epidemiyolojisi

ETEC sıklıkla gelişmekte olan ülkelerde çocuk diyare etkeni olarak göze çarpmaktadır. Özellikle süttten kesilmiş ve gıda alımına yeni başlamış çocukların bir anda anne sütünün koruyuculuğundan çıkıp, kontamine gıda ve sulara maruz kalması, hastalığın epidemiyolojisinde başlangıç noktasıdır. Gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar hayatlarının ilk beş yılında, birden fazla ETEC tablosu gösterebilmektedirler. Daha sonra immün sistemin direnç kazanmasıyla, çocukların asemptomatik taşıyıcı olmaları, etkenin saçılımında rol oynamaktadır (113). Avrupa ve Kuzey Amerika'da sayılı salgınlar dışında ETEC yaygın bir diyare sebebi olarak görülmemektedir (115).

Sağlıklı bireylerde ETEC enfeksiyonunun oluşabilmesi için yaklaşık 10^8 - 10^9 kob gibi yüksek sayılabilecek düzeyde etkenin alınması gerekmektedir. Bahsedilen bu düzeylere soğuk zincirin kırılması ile gıda ve sularda kolaylıkla ulaşılabilir. Mide asitliğinin nötre yaklaşması gibi konak nonspesifik savunma mekanizmalarının bozulması durumunda ise infeksiyöz dozun düşebileceği belirtilmektedir (116).

Seyahat hastalığı olarak bilinen ETEC enfeksiyonlarının görülme olasılığı seyahat edilen bölgede bireyin geçirdiği zamanla da ilişkilidir. On dört günü geçen seyahatlerde ETEC enfeksiyonunun oluşma olasılığının %50 oranında artacağı rapor edilmiştir (117, 118).

2.1.2.4. ETEC Enfeksiyonlarında Patojenite

2.1.2.4.1. Enterotoksinler

İki farklı enterotoksin olan LT ve ST'nin, ETEC suşlarının özelliklerini belirlemede ayırıcı oldukları kabul edilmektedir (119). Bu iki toksin tek bir suş tarafından salgılanabilir veya ayrı ayrıda bulunabilir. Bu durumun şekillenmesindeki en temel sebep plazmid ilişkili gen ekspresyonudur. Çoğu ETEC suşunda tek bir plazmid, LT, ST ve CFA genlerinin üçünü de taşıyabilmektedir. Bu sebeple ETEC suşlarının toksin üretim kabiliyetleri coğrafi olarak değişiklik göstermektedir. Kısaca LT denilen ısı labil

toksin 60 °C'de 30 dakikada inaktive olurken, ST herhangi bir ısıl işlemle etkilenmemektedir. Bu iki toksin dışında ayrıca bazı ETEC serotipleri tarafından salgılandığı belirlenen EAST adında üçüncü bir toksin daha belirlenmiştir (120). EAST toksinin tek başına patojenik potansiyelde olabileceği gösterilmiştir (121).

LT'ler, özellikle LT-I grubuna mensup olan insan orijinli LT (LTh), *V. cholerae* toksini (CT) ile oldukça benzerlik göstermektedir. Benzer mekanizmalar ile etki eden ve %80 benzer aminoasit dizilimine sahip bu toksinler, aynı antikorlar ile nötralize edilebilmektedir (119, 122).

LT'ler, katalitik olarak aktif olan bir A subünite ve 5B subüniteye sahiptir. B subüniteleri intestinal hücre yüzeyinde bulunan gangliosit GM₁'e bağlanma görevini üstlenmektedir. A subünitesi ise düzenleyici proteinlerin, ADP-ribozilasyonuna neden olarak hücre içinde dönüşümsüz olarak adenilat siklaz aktivasyonuna yol açmaktadır. Sonuç olarak intraselüler matrikste siklik adenozin monofosfat (cAMP) birikimi şekillenmekte ve protein kinaz aktivitesi artmaktadır. Bu aşamadan sonra hücrenin sodyum ve klor taşıma mekanizmaları bozulmaktadır. Böylece şekillenen diyarede önemli miktarda elektrolit kaybı yaşanmaktadır (113).

ST; boyut, yapı, antijenite ve etki mekanizmaları açısından LT'den farklılık göstermektedir. ST, disülfid bağları sayesinde, kaynama derecesinde 30 d'lık ısı işleminden sonra dahi inaktivasyona uğramamaktadır (107). ST'ler; STa ve STb (veya ST1 ve ST2) olmak üzere iki forma sahiptir. Her iki toksin formu da düşük molekül ağırlıklı protein yapıda olup antijenik karakter taşımaktadırlar. Ancak STa, insan enfeksiyonlarında öneme sahipken STb primer olarak domuzlarda antijenik karakterdedir. ST'lerin intestinal hücrede meydana getirdiği değişiklikler LT'ler ile benzerlik göstermemektedir. STa, insan enterositlerinde dönüşümsüz olarak guanilat siklaz stimülasyonuna yol açarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) birikimine yol açmaktadır (119, 123).

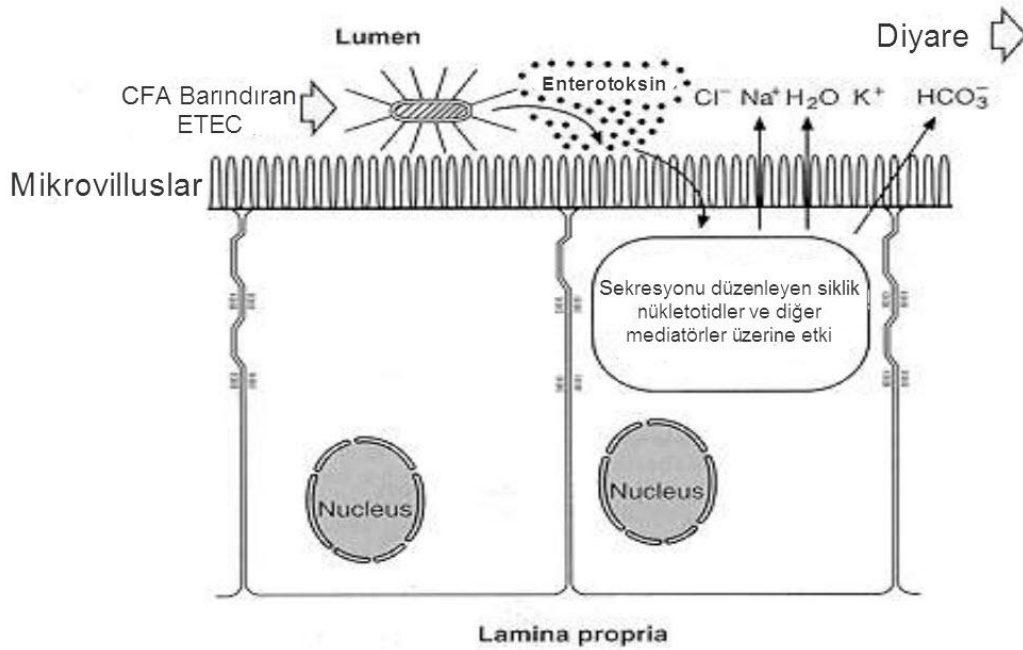
Günümüzde ETEC enfeksiyonlarının teşhisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler; GM₁ tabanlı ELISA, DNA-DNA hibridizasyon ve PCR metodu ile toksin genlerinin belirlenmesidir (124-128). Ayrıca LT tespiti için Y-1 adrenal hücrelerinin ya da Çin hamster ovaryum hücrelerinin (CHO) kullanıldığı doku kültürü yöntemleri de mevcuttur. Bu hücre kültürü yöntemlerinde, toksin varlığında şekillenen morfolojik

değişimler esas alınmaktadır. Ancak hücre kültürü metodu pahalı ve uzun zaman gerektirdiğinden çok fazla kullanılmamaktadır (129). Ayrıca ST, intestinal olmayan hücre kültürlerinde morfolojik bir değişikliğe sebep olmadığından, STa teşhisi için alternatif olarak yavru farelerin kullanıldığı hayvan modelleri geliştirilmiştir (123).

2.1.2.4.2. Kolonizasyon Faktör Antijenleri (CFA)

ETEC enfeksiyonlarının patogeneğinde toksin üretimi kadar kolonizasyon faktör antijenleri de (CFA) önemli rol oynamaktadır. Tekrarlı subüniteler içeren uzun protein yapılı bu antijenler özellikle proksimal bağırsak bölümlerinde bakterinin enterositlere tutunmasını sağlayarak enfeksiyonun klinik seyrini değiştirmektedir (130-131). CFA'lar; 6-7 nm çaplı sert yapılı ve esnek ve 2-4 nm çaplı ince olmak üzere iki çeşittirler. Tekrarlı protein subüniteleri oranları bakımından farklılık gösteren bu yapılar bakterinin yüzeyinde eşit oranda dağılım göstermektedirler. CFA gelişimi, 37 °C'de yapılan kültürlerde gözlemlenirken, 18 °C'lik inkübasyonlarda CFA proteinlerinin şekillenmediği ortaya konmuştur. CFA protein sentezinden sorumlu birçok DNA sekansı belirlenmiştir. Ayrıca, elektron mikroskopunda ETEC serogrubuna ait spesifik pilusların tüm bakterinin yüzeyini kapladığı görülmektedir (86).

Yapılan çalışmalarda (130-131) ETEC patogeneğinde rol oynayan birçok CFA tanımlanmıştır. CFA/I, CFA/II ve CFA/IV en sık rastlanan kolonizasyon faktörleridir. Yaygın olan ETEC suşlarının neredeyse tamamında CFA olduğu gösterilmiştir. Ancak bu virulens faktörüne sahip olmayan birçok ETEC suşunun varlığı da bilinmektedir. Örneğin sadece LT bazlı patojenite gösteren suşlarda CFA'ya rastlanmamıştır. CFA yardımıyla intestinal hücrelere tutunma kabiliyeti, konak spesifik özellik göstermekte dolayısıyla insanlarda şiddetli diyareye sebep olan birçok suş, hayvanlarda enfeksiyona yol açmamaktadır. CFA'lar plazmidler tarafından kodlanabilmekte ve aynı plazmid, hem toksin genlerini hem de CFA kodlayan genleri içerebilmektedir (110). ETEC'in hücresel patogenezi Şekil 2'de gösterilmektedir (132).



Şekil 2. ETEC'in hücresel patogenezi

2.1.3. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

EIEC serogrubu, virulens özelliklerini enterositlere invaze olabilmeleri ile göstermektedir. Bu grup bakteriler biyokimyasal özellikleri ve oluşturdıkları klinik tablo bakımından teşhiste *Shigella* ile karışabilmektedir. EIEC ilk kez, 1946 yılında Ewing ve Gravatti tarafından *Shigella* etkeninin izole edilemediği dizanteri benzeri enfeksiyonların incelenmesi ile tanımlanmıştır (133).

EIEC enfeksiyonları genellikle hemorajik olmayan şiddetli bir diyare, abdominal kramp, ateş ve kusma ile seyretmektedir. EIEC grubu patojenler, patojenik invazyon kabiliyetlerini daha iyi sergileyebilmelerinden dolayı genellikle kolonda yerleşim gösterirler. Temel etkiyi kolonda göstermeleri, kusma semptomunun hastalık patogenezindeki yerini belirsiz kılmaktadır. *Shigella*'nın sebep olduğu dizanteriye benzer şekilde hastalığın başında konstipasyon gözlenebilmektedir. EIEC enfeksiyonu herhangi bir tedavi sürecine girilmeden çoğunlukla iki gün içinde sona ermektedir. Ancak hassas bireylerde hastalığın prognozu kötüleşebileceğinden, antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Bu amaçla yetişkinlerde florokinolon grubu, çocuklarda ise trimetoprim-sülfometaksazol uygulamaları etkili olmaktadır (134-135).

2.1.3.1. EIEC Epidemiyolojisi

Enteroinvaziv *E. coli* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde asemptomatik taşıyıcılar oldukça önemli bir yere sahiptir (136). Etkenin teşhisi, salgınlar dışında pek mümkün değildir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tespit edilebilmiş EIEC salgınlarından bazılarının Fransız peynirlerinden, tofudan ve avokado ile yapılan bir Orta Amerika salatası olan guakamolden kaynaklandığı bildirilmiştir (137-138). Hastalık, gelişmekte olan ülkelerde genellikle *Shigella* enfeksiyonlarına benzer salgınlar şeklinde görülmektedir (139, 140). EIEC salgınlarının daha çok 3-5 yaş aralığındaki çocukları etkilediği bildirilmektedir (141). Ayrıca endemik olduğu coğrafi bölgelerde sporadik olarak seyahat hastalığına da yol açabilmektedir. EIEC saçılımında kişiden kişiye bulaşmanın da önemli olduğu bilinmektedir (142-145).

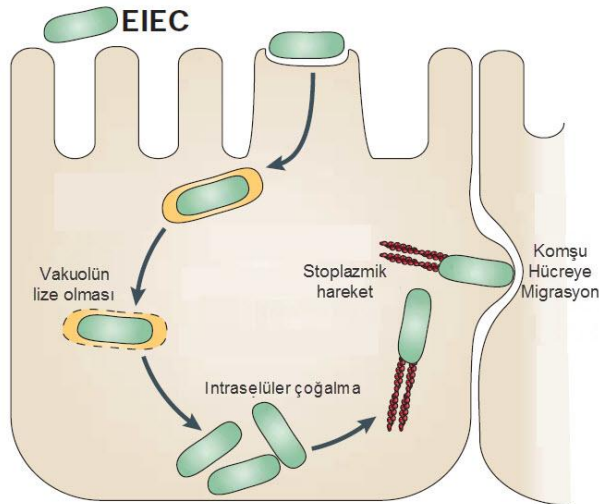
2.1.3.2. Enteroinvaziv *E. coli*'lerin Serogrupları

Bu gruba dahil olan en önemli serotipler, O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164 ve O167'dir (146, 147). EIEC, *Shigella* ile benzer O antijeni taşımaktadır. *Shigella* gibi enteroinvaziv *E.coli*'ler de lizin dekarboksilaz negatif ve hareketsizdirler (148). EIEC suşlarının önceleri laktozu fermente edemedikleri iddia edilmiş olsa da, son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar ile laktozu fermente edebilen izolatların da olduğu ortaya konmuştur (141).

EIEC kesin teşhisinde, hücre kültürü kullanılarak yapılan "Sereny testi" altın standart olarak değerlendirilmektedir (149). Epitel hücre hattına invazyon olup olmadığının belirlenmesi prensibine dayanan bu test, zahmetli olması ve profesyonel bir hücre kültürü laboratuvarına ihtiyaç duyulması sebebiyle çok tercih edilmemektedir. Bu sebeple invazyonla ilişkili genlerin PCR analizleri ile tespit yöntemi günümüzde daha çok uygulanmaktadır. Ayrıca 140 MDa ağırlığındaki EIEC plazmidinin varlığı ile şüpheli suşlar doğrulanabilmektedir (118, 150). EIEC şüpheli suşların bir diğer doğrulanma yöntemi ise invazyon ilişkili antijenlerin ELISA ile belirlenmesidir (151, 152).

2.1.3.3. EIEC Enfeksiyonlarında Patojenite

Shigella ile EIEC plazmid DNA'ları büyük oranda homoloji göstermektedir. Ancak birçok restriksiyon endonükleaz bölgeleri korunmamıştır. Plazmidde sahip olmayan EIEC suşları invazyon yeteneğine sahip değildir (153). Yapılan çalışmalarda invazyon yeteneğinin olabilmesi için 20 kilo baz çifti (kbp) uzunluğunda en az beş gen bölgesine ihtiyaç duyulduğu ortaya konmuştur. 140 MDa ağırlığındaki invazyon plazmidinde bulunan genler tarafında kodlanan IpaA, IpaB, IpaC ve IpaD plazmid antijenleri enfeksiyonun patogeneziinde önemli rol oynamaktadır. Bu antijenleri kodlayan gen bölgelerinde mutasyon şekillenmesi durumunda invazyon sekteye uğramaktadır (154). ETEC'in hücresel patogenezi Şekil 2'de gösterilmektedir (155).



Şekil 3. EIEC hücresel patogenezi

2.1.4. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) ve *E. coli* O157:H7

Diyarejenik *E. coli* gruplarına, 1975 yılında hemorajik diyare geçiren bir kadından *E. coli* O157:H7 serotipinin izole edilmesi sonrasında bir yenisi daha eklenmiştir. Hemorajik kolitis (HC) ile karakterize enfeksiyonların sorumlusu olarak gösterilen Enterohemorajik *E. coli* serogrubu, ölümle sonuçlanabilmektedir. Bu grup içinde *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli*'lerden oldukça farklı özellikler göstermektedir (156).

2.1.4.1. EHEC ve *E. coli* O157:H7'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Klasik kültür yöntemi ile *E. coli* O157:H7 veya EHEC serogrubundaki herhangi bir serotipi diğer *E. coli*'lerden ayırt etmek mümkün değildir. *E. coli* O157:H7 dışında EHEC serotipleri diğer *E.coli*'ler ile benzer biyokimyasal özellik göstermektedir. Örneğin bütün *E.coli*'ler gibi EHEC'ler de laktozu fermente edebilmektedirler. Ancak, *E. coli* O157:H7, diğer *E. coli*'ler gibi hızlı bir şekilde (48 saat içinde) sorbitol fermentasyonu gerçekleştirememektedir. Kısa sürede sorbitol fermentasyonu gerçekleştirebilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının da varlığı da ortaya koyulmuştur (157, 158). Buna ilaveten *E. coli* O157:H7'nin, glukuronidaz aktivitesine sahip olmadığından 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) hidrolizasyonunu gerçekleştiremediği kabul edilmektedir (159). Ancak son zamanlarda MUG pozitif *E. coli* O157:H7 izolatları da tespit edilmiştir (160-161).

E. coli O157:H7 broth içinde 30-42 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmektedir. Sıcaklığın 42 °C'nin üzerine çıkması ile üreme yavaşlamakta ve bu özellik etkenin diğer *E. coli*'ler ile ayrımında kullanılmaktadır. Etkenin dondurulmuş kırmızı ette varlığını sürdürebildiği (162), diğer *E. coli*'lere göre safra tuzlarına daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (163, 164). *E. coli* O157:H7 serotipi ayrıca hidrojen sülfür oluşturabilmekte, Voges-Proskauer ve sorbitol negatif, indol, metil red, hareket ve lizin dekarboksilaz pozitif sonuç vermektedir (165-166).

E. coli O157:H7, verotoksin salgılama özelliğine sahiptir. Verotoksinler, Vero (Afrika Yeşil Maymun Böbreği) hücrelerinde sitotoksik etki gösterdikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir (167). Verotoksinler yapısal, fonksiyonel ve antijenik yanıt bakımından *Shigella dysenteriae* tarafından salgılanan Stx'lere oldukça benzerlik göstermektedir. Verotoksin ve Shiga toksin ya da Shiga Like Toksin (SLT) ibareleri eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (169).

EPEC serogrubunda bulunan bazı *E. coli* izolatlarının da Stx üretebildikleri belirlenmiştir. Stx üretimi tek başına EHEC grubuna ait olmak için yeterli bir veri değildir. Bu sebeple son zamanlarda farklı bir grup Shiga toksijenik *E. coli* grubundan (STEC) söz edilmeye başlanmıştır. EHEC'e dahil olan tüm *E. coli*'ler insan için patojen iken, STEC suşlarından bazılarının insanda enfeksiyon oluşturmadığı ortaya konmuştur. Herhangi bir *E. coli* izolatının EHEC grubuna dahil olabilmesi için, Stx üretmesi, 60

MDa ağırlığında plazmid barındırması ve hayvan modelinde intestinal epitele tutunarak histopatolojik lezyonlar oluşturmaları gerekmektedir. Bu lezyonların oluşması ile hastalığın seyrinde hemorajik diyare gözlenmektedir (170).

EHEC grubu için referans ve prototip serotip *E. coli* O157:H7'dir. Bu serotip dışında ayrıca O26:H32, O55:H7, O111: H8, O113:H21ve O117:H14 serotiplerinin de EHEC grubuna dahil oldukları bildirilmektedir (171, 172). *E. coli* O157:H7 hemolizin ve enterohemolizin (Ehly) üretebilmekte ve bu özelliği sayesinde kanlı agarda hemoliz yapmaktadır. Bu hemoliz, diğer *E. coli*'lerin α -hemolizin ile oluşturduğu hemolizden farklılık göstermektedir. Ehly hemolizinin tespiti için özel bir besi yerine (Washed Sheep Red Blood Cell Agar) ihtiyaç duyulmaktadır (171). *E. coli* O157:H7'de enterohemolizin özelliği 60 MDa ağırlığındaki bir plazmidin varlığı ile mümkündür. Bu plazmid *E. coli* O157:H7 dışında diğer bazı EHEC şuşlarında da bulunabilmektedir (136).

2.1.4.2. EHEC Epidemiyolojisi

E. coli O157:H7, her yaştaki bireyde enfeksiyon oluşturabilmektedir. Fırsatçı bir patojen olması dolayısıyla sadece hassas grupta değil sağlıklı bireylerde de akut veya kronik enfeksiyonlar meydana getirebilmektedir (173).

Yapılan salgın araştırmalarında *E. coli* O157:H7'nin inkubasyon periyodunun 1-9 gün aralığında olduğu bildirilmektedir. Gıda kaynaklı salgınların yayılımında gıdaların kontaminasyon düzeyi oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra konak direnci, mide asitliği ve antibiyotik kullanımı gibi bireysel faktörler salgınların şiddetini etkilemektedir. *E. coli* O157:H7 epidemiyolojisinde kişiden kişiye bulaşmanın da önemli olduğu rapor edilmiştir (173).

E. coli O157:H7 salgınlarının bazılarında, ABD'de 501 vakadan 3 ölüm (174), İskoçya'da 501 vakadan 20 ölüm (175) meydana gelmiş ve Japonya'da yaşanan bir salgında ise 5000 kişinin etkilendiği görülmüştür (176). Bu gibi ciddi salgınlar ülkelerin halk sağlığı sistemlerinin sorgulanmasına neden olmuştur. Düşük enfektif doza sahip *E. coli* O157:H7 gibi güçlü patojenlerin oluşturduğu risklerin azaltılması için gıda güvenlik sistemlerinin doğru şekilde uygulanması gerekmektedir (177).

2.1.4.3. EHEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular

EHEC enfeksiyonlarında ilk olarak orta şiddette hemorajik olmayan bir diyare gözlenmektedir. Yaklaşık 24 saat içinde abdominal kramp ve karın ağrısı ile birlikte diyare şiddetlenmekte ve hemorajik bir hal almaktadır (178). Yüksek şiddette rektal kanama; mezenterik enfarktüs, Meckel divertikülü (rektal kanama ile seyreden gelişme anomalisi) gibi enfeksiyöz olmayan bazı sebepleri akla getireceğinden hastalığın teşhisinde yanılgıya düşülebilmektedir. EHEC enfeksiyonlarında hospitalizasyon oranı (>%50) diğer diyarejenik *E. coli* enfeksiyonlarına oranla oldukça yüksektir. Ancak klinik veriler, hemorajik olmayan diyare ile seyreden *E. coli* O157:H7 vakalarının da olduğunu göstermektedir (179-181). Bu durum enfekte bireyin güçlü bir immun sisteme sahip olmasıyla açıklanmaktadır (181).

Salmonella, *Shigella* ve *Campylobacter* gibi diğer enterik patojenlere benzer şekilde *E. coli* O157:H7'nin de hastalığın atlatılmasından sonra asemptomatik taşıyıcılarla saçılabilirdiği bilinmektedir (182). Yapılan saha taramalarında diyare gözlenmeyen bireylerin, dışkı kültüründe de *E. coli* O157:H7 varlığı rapor edilmiştir. Bu gibi verilere rağmen *E. coli* O157:H7 asemptomatik taşıyıcı sıklığı ve insidensi tam anlamıyla bilinmemektedir (158).

E. coli O157:H7'nin hemorajik kolitis dışında sebep olduğu bir başka ciddi komplikasyonda Hemolitik Üremik Sendrom (HUS)'dur. 1955 yılında ilk kez tanımlanan HUS, Coombs negatif hemolitik anemi, trombositopeni ve akut renal yetmezlik ile kombine bir klinik tablo oluşturmaktadır. *E. coli* O157:H7 salgınlarında HUS görülme sıklığı enfeksiyonu geçiren hastalarda %6-90 gibi oldukça değişken oranlarda görülmektedir. Bu enfeksiyonda gözlenen klinik tablonun, yaş, immunsupresif durum, antibiyotik kullanımı, antimotilite ajanlarının varlığı ve toksin üretimi tipi gibi faktörler nedeniyle farklılık gösterdiği düşünülmektedir (86).

E. coli O157:H7 enfeksiyonlarında gözlemlenen bir başka sendrom da Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP)'dır. Bu hastalıkta da HUS'a benzer şekilde hemolitik anemi, trombositopeni ve renal yetmezlik gözlenir. Bunların yanı sıra ateş ve mental bozukluklar da şekillenmektedir. TTP görülen hastaların tamamında hemorajik diyare geçmişi dikkati çekmektedir (183-185).

2.1.4.4. *E. coli* O157:H7 İzolasyonu ve İdentifikasyonu

E. coli O157:H7 serotipinin izolasyonu ve identifikasyonunda temel olarak kullanılan prensip sorbitol fermentasyonu yetersizliğidir (186). Sorbitol MacConkey agara ekim yapılmış süpheli renksiz kolonilere çeşitli biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Biyokimyasal testlerin yanı sıra lamel, tüp veya latex aglütinasyon metodlarından biri kullanılmaktadır. H7 flagellar antijeninin serolojik olarak tanımlandığı, motilitenin gözlemlenebildiği tek tüp veya agar bazlı yöntemler de bulunmaktadır (186-187). Fakat bu gibi konvansiyonel ve serolojik testlerin yanı sıra daha kesin sonuç veren PCR gibi genetik tabanlı moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. PCR ile O157 antijeninin tespiti için *rfb* gen bölgesi (188), H7 için ise *flic* gen varlığı incelenmektedir (189).

E. coli O157:H7'nin alt tiplendirilmesinde plazmid profili, toksin tipi, faj tiplendirme, izoenzim tiplendirme ve PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) analizi gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir (190-192). Bunların yanı sıra ribotiplendirme, IS (Insertion Sequence) subtiplendirme, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi daha nadir kullanılan yöntemler de bulunmaktadır (193-195).

Stx varlığının belirlenmesi için enfekte dışkıdan ya da kültüre edilmiş izolattan filtrasyon yapılabilir. Bunun yanı sıra Stx varlığı doku kültür yöntemi (Vero hücre hattında) ile de ortaya konabilir. Stx tespitinde en çok kullanılan yöntemlerden biri de ELISA'dır. Bunun yanı sıra latex aglütinasyon, koloni immunoblot analizi ve PCR ile toksin genlerinin tespiti de uygulanabilir. Toksinin direk kendisinin tespiti ile ilgili yapılan analizler çok hassas ve yalancı pozitiflik verilme olasılığı yüksek analizlerdir. Ayrıca enterohemolizin özelliği ve bu özelliği kodlayan *ehly* plazmid genlerinin tespiti de *E. coli* O157:H7 doğrulanmasında kullanılabilir (196).

2.1.4.5. EHEC Enfeksiyonlarında Patojenite

EHEC tarafından salgılanan ve oluşturdukları patojenitede primer rol oynayan Stx1 ve Stx2 toksinleri (LT toksinine benzer şekilde) katalitik olarak aktif olan bir A subünite ve beş B subüniteye sahiptirler. Toksinler bu subüniteler sayesinde globotriaosilseramid (Gb₃) adı verilen hücre membran reseptörlerine tutunarak patolojik değişiklikler oluşturmaktadır. Her iki ünite de bakteriyofajlar tarafından kodlanmaktadır. Sığırlarda

Gb₃ reseptörü bulunmadığından *E. coli* O157:H7 bu hayvanlarda hastalık tablosu şekillendirmemektedir. *E. coli* O157:H7, Stx1 ve Stx2'nin ikisini birden salgılayabilmektedir (197). Stx1, Shiga toksin'den sadece tek bir aminoasit ile farklılık gösterir. Ayrıca Stx1 ve Stx2 yapısal olarak %58 oranında homoloji göstermektedir. Bazı EHEC suşları, Stx2 kodlayan genlerden iki tane barındırmaktadır. Birbirinden farklı DNA sekansına sahip olan bu genler, belli antiserumların kullanıldığı çapraz nötralizasyon testlerinin yetersiz kalmasına ve toksinlerin hedef hücre hatları üzerindeki biyolojik aktivitelerin farklı olmasına sebep olmaktadır (198, 199).

Domuz kaynaklı STEC suşlarının oluşturduğu Stx2e (SLT-IIe veya VT2e) adı verilen üçüncü bir toksin daha bulunmaktadır (200). Stx2 ile homolog gen dizilimine sahip olmasına rağmen bu toksinin, özellikle B subünitelerindeki değişiklikler sebebiyle Stx2'den farklı konak hücre yüzey reseptörüne bağlandığı tespit edilmiştir. Stx2e, tıpkı diğer verotoksinler gibi Vero hücrelerini etkileyebilmekte ancak HeLa hücrelerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır. Stx2e pozitif suşların insanlarda hastalık yapıp yapmadığı henüz kanıtlanmamıştır (201-202).

EHEC toksinleri konak hücrede protein sentezini inhibe ederek etkili olmaktadır. Bu toksinlerin N-glikosidaz aktiviteleri, konak hücre ribozomunun 60S subünitesinde bulunan 28S ribozomal RNA'larında ayrılmaya neden olmaktadır. Stx1 ve Stx2'nin pikogram düzeyleri dahi sitotoksik etkinlik için yeterlidir. Bu toksinlerin biyolojik aktiviteleri hem Vero hem de HeLa hücre hatlarında gösterilebilmekte ancak hedef reseptörlerin olmadığı hücre hatlarında herhangi bir patolojik değişiklik yapmamaktadır (203).

EHEC toksinlerinin diyare oluşumu ve şekillenen mikroanjyopati mekanizması üzerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (204). Özellikle HUS patogenezindeki rollerinin tam olarak bilinmediği ortaya konmuştur. EHEC patogenezinin oluşumunda gözlemlenen farklılıklar, bireysel faktörlerin yanı sıra toksin çeşitliliği, *eae* ve enterohemolizin etkinliği gibi suşa bağımlı değişkenler neticesindedir (205).

Enteropatojenik *E. coli*'ler gibi *E. coli* O157:H7'de epitel hücrelerde A/E lezyonlarına neden olmaktadır. *E. coli* O157:H7 serotipine has bir protein olan intimin_{O157}, *eae*_{O157} geni tarafından kodlanmakta ve c-terminal sonlanmasında EPEC intimini ile farklılık göstermektedir. Ancak diğer intiminler gibi bu dış membran proteini de konak epitel

yüzey reseptörlerine bağlanarak A/E lezyonlarına yol açmaktadır. Ancak EPEC intimin farklılığından dolayı genellikle ince bağırsak bölümlerine afinite gösterirken, *E. coli* O157:H7 kolon gibi büyük bağırsak bölümlerinde kolonize olmaktadır (206).

EHEC enfeksiyonlarının bir kompilkasyonu olan HUS, böbreklerde glomeruler endotelde hücre yıkımlanması ile karakterizedir. Bu lezyonlar, intestinal kanalda salınmış olan toksinlerin sistemik toksemi sonucunda böbreklere ulaşması ile şekillenmektedir. HUS atlatmış hastaların kan serumundan toksin nötralizasyon antikorları tespit edilebilmektedir (207).

2.1.5. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

Enteroagregatif *E. coli*'ler intestinal lümende tutundukları enterositlerin yüzeyinde kendilerine has bir agregatif aderenz (AA) oluşturarak, hücrelerin faaliyet göstermesini engellemektedirler. Aynı zamanda Enteropatojenik *E. coli*'lerin de HEp-2 hücrelerinde gösterdikleri aderenz özellik sayesinde konak hücre yüzeyinde mikrokoloniler oluşturduğu bilinmektedir. Adereniz mekanizmaları, EAEC ile EPEC patogenezi arasındaki farkı oluşturmaktadır. EPEC'de mikrokoloniler şekillenirken, EAEC'de kitlesel agregasyonlar görülmektedir. Agregatif aderenz (AA) aynı zamanda diffuz aderenzden de farklılık göstermektedir. Agregatif aderenz durumunda etkenler konak hücre yüzeyinde yığılma gösterirken diffuz aderenzde dağınık durmaktadır (208, 209).

2.1.5.1. Enteroagregatif *E. coli*'lerin Serogrupları

EAEC'nin serotipleri, O3:H2, O15:H18, O44:H18, O86:NM, O77:H18, O111:H21, O127:H7 ve O tiplendirilmemiş:H10'dur (171). EAEC'leri diğer diyarejenik *E. coli*'lerden ayıran farklı bir izolasyon yöntemi bulunmamaktadır. Bununla birlikte EAEC'lerin tam anlamıyla ayrımında kullanılabilecek altın standart HEp-2 hücre hattında agregatif aderenz (AA) görülmesidir (210). EAEC'lerin doğrulanmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri de DNA tabanlı PCR analizleridir. Bu amaçla spesifik *aggR*, *aatA* ve kromozomal *aaiC* gen bölgeleri hedef alınmaktadır (211-213).

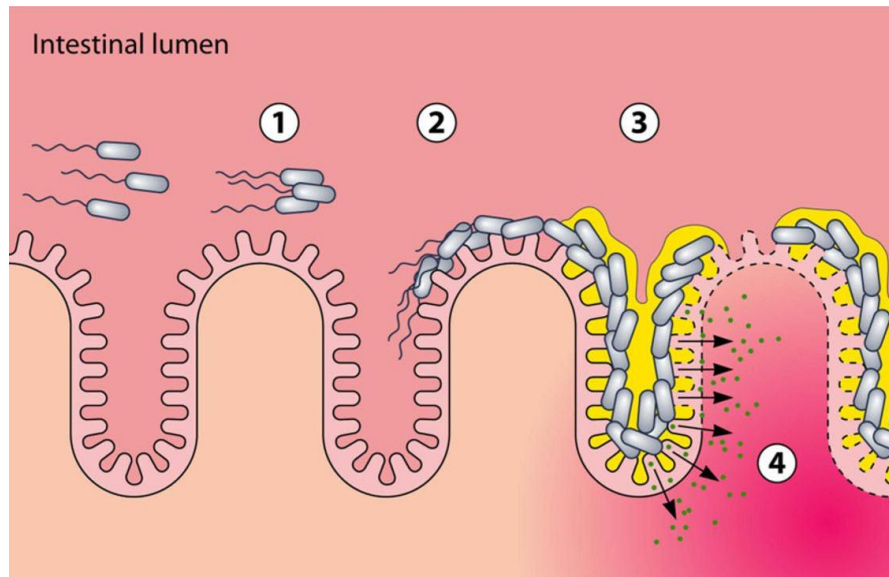
2.1.5.2. EAEC'in Oluşturduğu Klinik Bulgular

EAEC enfeksiyonlarında gözlenen en önemli klinik bulgu, yangısal olmayan sulu bir diyaredir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde diyare, mukoid bir hal almaktadır.

Özellikle bir yaştan altındaki çocuklarda ve hassas bireylerde gözlenen diyarenin persistent olduğu ortaya konmuştur (214-215). Diyare ile birlikte dehidrasyon, mide bulantısı ve iştahsızlık gözlenebilmektedir. Hastalığın inkubasyon süresinin 8-52 saat arasında olduğu bilinmektedir (216, 217). HIV gibi immunsupresyon durumlarında hastalığın daha uzun süreli olduğu ve dışkıdan etkenin çok daha yoğun şekilde izole edildiği bildirilmiştir (218, 219).

2.1.5.3. EAEC Enfeksiyonlarında Patojenite

Hastalığın patogenezi agregatif aderenz fenotipi ile açıklanmaktadır. Bu fenotip sırasıyla, mukozal intestinal yüzeye tutunma, biofilm oluşturma, immun yanıt şekillenmesi ve son olarak toksin üretimi ile açıklanmaktadır. ETEC' patogenezi Şekil 4'de gösterilmektedir (220).



Şekil 4. EAEC patogenezinin aşamaları. 1. EAEC Aglutinasyonu 2. İntestinal epitelyuma adrenz ve kolonizasyon 3. Biofilm oluşumu 4. Bakteriye toksinlerin salınımı ile enterositlerin hasar görmesi ve salgı artışı

Etkenin adezyonunda “Agregatif Aderenz Fimbria (AAF)” adı verilen yapıların rol aldığı bilinmektedir. EAEC etkenlerinin genellikle kolon ve ileumun son kısımlarında kolonize olduğu düşünülmektedir (221, 222). Etkenin lümeninde tutunması ile birlikte *AggR* geni etkisiyle etkene has agregasyon şekillenmektedir. *AggR* geninin bulunması etkenin EAEC serogrubuna ait olduğunun göstergesidir. EAEC kolonizasyonu ile birlikte bölgede mukus üretimi normalin üstüne çıkmaktadır. Yığın halde etken barındıran bu mukus tabaka bir biyofilmi andırmaktadır (221). AAF ekspresyonunun ve *shf* geninin biyofilm oluşumunda büyük rol oynadığı belirtilmektedir (223). Tipik

Enteroagregatif *E.coli* enfeksiyonlarında meydana gelen diyarede, biyofilm oluşumunu takiben etken tarafından üretilen STenterotoksinin rol aldığı bildirilmektedir (220). Bu toksine bazı EAEC suşları yanı sıra EHEC suşlarının da sahip olduğu ortaya konmuştur (224).

2.1.6. Diyarejenik *E. coli*'lerin Epidemiyolojisinde Gıda ve Suyun Önemi

Aynı evi paylaşan insanlar arasındaki yayılma şeklinin araştırılmasıyla, diyarejenik *E. coli*'lerin yayılmasında gıdaların önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Özellikle gelişmiş ülkelerde salgın verilerinin daha iyi elde edilmesi, hastalık epidemiyolojisinin daha sağlıklı ortaya konmasına imkan vermektedir (225).

ETEC primer olarak gıda ve su kaynaklı saçılım göstermekte, kişiden kişiye bulaşma daha nadir şekillenmektedir. Bunun temel nedeni hastalığın oluşabilmesi için 10^8 kob gibi yüksek sayıda etkene ihtiyaç duyulmasıdır (105). Soğuk zincirde saklanmayan gıdaların veya fekal kontamine suların tüketilmesi minimal enfektif dozun alınabilmesine olanak verebilmektedir (225). Çiğ sebzeler, tüketime hazır salatalar, kontamine su ve buzlar ETEC bakımından riskli sayılmaktadır (226). ETEC enfeksiyonlarındaki toksin oluşumu üzerine çevresel koşullar herhangi bir etkiye sahip değildir. Bu sebeple gıdalar ile alınan preforme toksinler enfeksiyon tablosu oluşturmada yetersiz kalırlar. Enfeksiyon şekillenebilmesi için gıdalar ile yeterli düzeyde ETEC alınması ve toksin sentezinin bağırsakta da gerçekleşmesi gerekmektedir (227).

Yetişkinlerde gözlenen EPEC kaynaklı diyare salgınlarının yayılmasında gıda ve suların rol aldığı bildirilmiştir (228). EPEC için de minimal enfektif dozun 10^8 kob olduğu bilinmektedir. Ancak her iki serogrubunda infantlarda ve diğer hassas bireylerde minimal enfeksiyon dozunun daha düşük olduğu bilinmektedir. Ayrıca infantlarda şekillenebilecek başta *E. coli* O157:H7 olmak üzere, diyarejenik *E. coli*'lerin yayılmasında kreşler, bakıcılar ve aile bireylerinin hijyen bilinci de büyük rol oynamaktadır (229).

Etiyolojisi belirlenmiş olan EIEC salgınlarının neredeyse tamamının gıda kaynaklı olduğu bildirilmiştir. EIEC enfeksiyonlarda primer kaynak *Shigella*'da olduğu gibi

insandır. Gıdalarla temas eden insanların ve fekal kontamine suların hastalığın saçılımında rol oynadığı bildirilmektedir (228).

E. coli O157:H7'nin, 1982 yılında iyi pişirilmemiş hamburger köfteleriyle sonra da diğer benzer gıdalar ile salgınlara yol açması, etkeninin önemli bir gıda patojeni olarak kabul edilmesine yol açmıştır (230). Sığır eti ve ürünlerinin *E. coli* O157:H7'nin bilinen en önemli bulaşma kaynağı olduğu bildirilmektedir (231, 232). Bununla birlikte ABD ve İngiltere'de pastörize edilmemiş süt kaynaklı *E. coli* O157:H7 salgınları da rapor edilmiştir. *E. coli* O157:H7, başta sığırlar olmak üzere memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve tüm çevreye yayılmaktadır. *E. coli* O157:H7, çiğ ya da yeterli ısı işlemi görmemiş hayvansal gıdaların, kontamine besinlerin ve suların tüketilmesi ile bulaşmaktadır. Etkenin bulaşmasında başlıca rezervuarlar sığırlardır (233-236). Aynı zamanda sığır dışkısı ile kontamine içme suları ve bitkisel ürünlerin tüketilmesi de salgınlarda önemli rol oynamaktadır (237, 238). Kesimhanelerde sıklıkla derinin yüzülmesi ve iç organların çıkarılması sırasında sığır eti kontamine olmaktadır. Etin kıyılması ve parçalanması sırasında yüzeyden iç kısımlara geçen etken, yeterli ısı işlemi uygulanmadığında canlılığını sürdürebilmekte ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir (239-241).

Minimal infektif dozunun düşük olması sebebiyle *E. coli* O157:H7, tüketime hazır gıdalar ve marul, soya ve turp gibi sebzelerde ciddi risk oluşturabilmektedir (164, 242). Ayrıca pastörize edilmeden tüketilen elma suyu gibi asitli meyve suları da hastalık kaynağı olabilmektedir (243). *E. coli* O157:H7 serotipi <4 pH değerlerine kadar canlılığını muhafaza edebilmektedir (244). Bu nedenle meyve suları ve sucuk gibi düşük pH'lı besinlerde varlığını sürdürebilmektedir (26,173,245). Asidik gıdalar mikrobiyel riskler açısından genellikle güvenli kabul edilmekle birlikte *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* gibi aside direnç gösteren patojenler sucuk benzeri düşük pH'lı gıdalarda problem oluşturabilmektedir (244).

Su kaynaklı *E. coli* O157:H7 salgınları da bildirilmiştir (246, 247). Gıda kaynaklı diyarejenik *E. coli*'lerin hastalık oluşturmaları gıdaların muhafazasında soğuk zincirin kırılması ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca yaz aylarında bakteriyel üremenin kış aylarına oranla artış göstermesi, vakaların sıklığını da arttırmaktadır (12).

2.2. SALMONELLA

Salmonella, Enterobacteriaceae familyasına ait Gram negatif bir bakteridir (248). Çevrede çok geniş bir yayılım göstermekte olan bu etken, sıcakkanlı canlılarda sistemik ya da enterik enfeksiyonlar şekillendirebilmektedir. *Salmonella* kaynaklı hastalıkların şiddeti, etkenin serotipi ve konak durumu ile doğrudan ilişkilidir. *Salmonella*'nın konak spesifik serotipleri olmakla birlikte bazı serotiplerinin oldukça geniş bir konak çeşitliliği olduğu bilinmektedir (249-251).

Eberth tarafından ilk kez 1880'lerde fark edilen, daha sonra Gaffky tarafından daha detaylı şekilde tanımlanan *Salmonella*, insanlarda tifoid ateşe yol açan bir basil olarak literatüre girmiştir. D. E. Salmon tarafından yapılan detaylı bakteriyolojik çalışmalar neticesinde karakteristik özellikleri ortaya konan bakteri, 1900 yılında *Salmonella* olarak isimlendirilmiştir (252).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan ve günümüzde kabul görmüş olan klasifikasyona göre, *Salmonella* cinsi, *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* olmak üzere iki türe ayrılmakta, *Salmonella enterica* ise *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olmak üzere 6 farklı alt türe ayrılmaktadır (253-255). *Salmonella* türlerinin ve içerdiği serotiplerin isimlendirilmesinde genel olarak tıp ve veteriner hekimlik terimleri kullanılmıştır. *Salmonella* Typhi gibi hastalığın seyrine ya da *Salmonella* Pullorum gibi konağa atıf yapılarak isimlendirmeler yapılmış olmakla birlikte kimi zaman *Salmonella arizonae*'da olduğu gibi etkenin ilk izole edildiği coğrafi bölge de isimlendirmede kabul görmüştür. İnsan *Salmonella* hastalıklarının %99'una sebep olan *Salmonella enterica*'nın alttürlerine ait serotiplerin isimlendirilmesinde kısaltmalar kullanılabilir. Örneğin, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Typhimurium kısaca *Salmonella* Typhimurium olarak isimlendirilmektedir (256).

2.2.1. *Salmonella*'nın Biyokimyasal Özellikleri ve İzolasyonu

Salmonella üreyebilmek için nitrojen, fosfor, sülfür gibi inorganik katyonlar ve karbon bazlı enerji kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır (257). *Salmonella* türleri 35-37 °C'lerde ve 6,5-7,5 pH aralığında optimum üreme gösterirken 4-48°C arasındaki sıcaklıklarda da

üreyebilmektedir (259-261). *Salmonella*'nın bazı biyokimyasal özellikleri Tablo 3'de gösterilmektedir (262).

Tablo 3. *Salmonella*'nın bazı biyokimyasal özellikleri

Özellik	Reaksiyon
Gram	-
Katalaz	+
Oksidaz	-
Laktozdan asit üretimi	-
Glukozdan gaz üretimi ^a	+
İndol	-
Üreaz	-
H ₂ S	+
Karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı ^a	+
Metil Red	+
Voges-Proskauer	-
Lizin dekarboksilaz	+
Ornitin dekarboksilaz	+

+: Pozitif reaksiyon; -:Negatif reaksiyon

^a: Typhi bu testler bakımından negatiftir.

Salmonella sporsuz, oksidaz negatif, fakültatif anaerob bir bakteri türüdür. İndol negatif olan bakteri, üre hidrolizasyonu gerçekleştirememektedir. Fenilalanin ve triptofan aminoasitlerinde deaminasyon oluşturmamaktadır. Türlerin çoğu nitrati nitrite indirgeyebilmektedir. Asit üretebilme yetenekleri ile birçok karbonhidratı fermente ederek yaşamsal faaliyetleri için enerji sağlamaktadır. Bahsedilen bu biyokimyasal özellikleri, *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılmaktadır. Örneğin D-glukoz fermentasyonu sayesinde pozitif metil red reaksiyonu vermektedir. *Salmonella*, asetil metil karbinol sentezleyemediğinden Voges-Proskauer negatif sonuç vermektedir. *Salmonella*'lar flagellar hareket gösterdikleri için motil kabul edilirler. Ancak *Salmonella* Pullorum ve Gallinarum türleri hareketli değildirler (263).

Hidrojen sülfid oluşturma, *Salmonella*'nın karakteristiğinde önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra çoğu *Salmonella* türü lizin, arjinin, ornitin gibi aminoasitleri

dekarboksile edebilmektedir. Ancak *Salmonella arizonae* ve *diarizonae*'nın dekarboksilasyon yeteneğinin olmadığı belirlenmiştir. *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin temel aldığı bir diğer özellik ise *Salmonella*'ların laktozu fermente edememesidir (252, 264). *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan başlıca besi yerleri, Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) agar, Salmonella-Shigella (SS) agar, Rambach agar, Brilliant Green agar, Brilliant Green Sulfite agar, Hektoen agar, MacConkey agar, Lysine Iron Agar (LIA), Triple Sugar Iron (TSI) agar, Dulcitol Laktose Iron agar, Kliger Iron agar, Eosin-Methylene Blue (EMB) agar ve Desoxycholate Citrate agar olarak gösterilmektedir (264-267).

Salmonella izolasyonunda selektif besi yerine direk ekim yapılabilmeyle birlikte daha hassas tespit için ön zenginleştirme yapılması önerilmektedir. Ön zenginleştirme işleminde *Salmonella* aranan numuneden önce viabil bakterilerin üreyebildiği tamponlanmış peptonlu su veya triptik soy broth gibi genel bir besi yerine ekim yapılır. Bu işlemin temel amacı aranan bakterininin sayısal olarak artırılması ve hasarlı olanlarının ise iyileşerek koloni oluşturabilmelerinin sağlanmasıdır (268). Ön zenginleştirme işleminden sonra zenginleştirme işlemi yapılmaktadır. Bu işlemde hedef bakterinin üremesi stimüle edilirken ön zenginleştirmede üremiş diğer mikroorganizmaların baskılanması amaçlanmaktadır (268). *Salmonella* izolasyonunda yaygın olarak kullanılan zenginleştirme besi yerlerine; başta Rappaport Vassiliadis Broth olmak üzere Muller-Kauffman Tetrathionate Broth, Brilliant Green Broth ve Leifson Selenite Cystine Broth örnek olarak verilebilir (269-271). Zenginleştirme işleminden sonra selektif agarlara ekimler yapıldıktan sonra uygun koşullarda inkübe edilerek şüpheli *Salmonella* kolonileri elde edilmektedir (268, 272).

Salmonella şüpheli kolonilerin doğrulanmasında biyokimyasal ve serolojik testler kullanılmaktadır. Biyokimyasal olarak doğrulanması istenilen şüpheli kolonilerden LIA, TSI ve üre agarlara ekimler yapılmaktadır. İndol ve nitrat testleri uygulanmaktadır (263, 268).

Bütün *Salmonella* spp. izolatlarının biyokimyasal özelliklerin tamamını göstermediği bildirilmektedir. Örneğin, CDC (Centers for Disease Control and Prevention)'ye gönderilmiş *Salmonella* izolatlarının %1'inin laktozu fermente edebildiği rapor edilmiştir. Bu durum klasik kültür yönteminin sadece biyokimyasal olarak

desteklenmesinin yeterli olmayacağını ortaya koymaktadır. Bu sebeple şüpheli bir koloninin *Salmonella* açısından doğrulanabilmesi için biyokimyasal testlerin yanı sıra serolojik ve moleküler yöntemlerin de kullanılması gerekmektedir (251).

Salmonella izolasyon ve identifikasyonunda uygulanan ön zenginleştirme, zenginleştirme, selektif agarlara ekim ve biyokimyasal doğrulama gibi basamakların her biri en az bir günlük inkübasyona ihtiyaç duymaktadır. Bu sebeple *Salmonella* teşhisinde hızlı tekniklerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. *Salmonella*'nın hızlı identifikasyonu için; API (bioMerieux), Micro-ID (General Diagnostics), Minitek (BiopQuest) ve RapID OnE gibi sistemler örnek olarak verilebilir (273-276).

Şüpheli *Salmonella* izolatlarının doğrulanması için uygulanan başlıca serolojik testler, ELISA, immunodifüzyon metodu ve immunomanyetik seperasyon yöntemleridir. Genomik olarak *Salmonella*'ların moleküler doğrulanmasında yaygın olarak kullanılan PCR yönteminin yanında In-situ hibridizasyon metodu da kullanılmaktadır (277).

2.2.2. *Salmonella*'larda Serotiplendirme

Salmonella spp. olarak tanımlanan izolatların serotiplendirilmesinde bakteri yüzeyindeki antijenik determinantların hedef alındığı immunolojik reaksiyonlar kullanılmaktadır. WHO tarafından onaylanmış ve günümüzde kullanılmaya devam eden Kauffmann-White şeması, *Salmonella* serotiplerini hücre yüzeylerindeki somatik O ve flagellar H antijen farklılıklarına göre sınıflandırmaktadır. Bu şemaya göre 2300'ün üzerinde *Salmonella* serotipi bildirilmektedir (253).

Ticari anlamda O antijenlerine karşı geliştirilen antiserumların yaygınlaşması, *Salmonella* serogruplandırmasını pratik hale getirmiştir. Bazı serotipler arasında gerçekleşebilen çapraz aglütinasyon reaksiyonları rutin serotiplendirmeyi zorlaştırabilmektedir (268). Dahası *Salmonella* lipopolisakkaritlerinin sahip olduğu polisakkaritler, plazmid gibi genetik elementlerin etkisi yüzünden değişkenlik göstermektedir (254, 256). İzolatta şekillenmiş olan faja bağlı değişimler de bahsedilen polisakkarit yapıda ve etkenin virulens özelliklerinde farklılıklar şekillendirebilmektedir (278-281).

Salmonella genusu genel itibarı ile kapsülsüzdür. Buna karşın *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Dublin ve *Salmonella* Paratyphi C suşlarının kapsüler antijen taşıdıkları rapor edilmiştir. “Vi” olarak adlandırılan bu virulens faktörün, O antijenini antiseruma karşı dirençli hale getirdiği ortaya konmuştur (252). Bu sebeple biyokimyasal olarak doğrulanmış bir *Salmonella* spp. izolatının serotiplendirmesinde hatalı negatiflik gibi bir durum ile karşılaşılabilir. Bu durumun aşılabilmesi için izolatın Vi antijenine ait antiserum ile test edilmesi gerekmektedir. Kapsüllü olduğu serolojik olarak ortaya konan suş kapsülünün uzaklaştırılabilmesi için kaynatma işlemi uygulanmalıdır. O antijeni yapısal olarak ısıya dayanıklı olduğundan kaynatma işleminden etkilenmeyecek ve kapsül uzaklaştığı için aglütinasyon işlemi gerçekleştirilebilecektir (252). *Salmonella*’ların ayrımında, serotiplendirme dışında biyotiplendirme, faj tiplendirme, moleküler tiplendirme gibi farklı yöntemlerde kullanılmaktadır (282-284).

Suşlar arasında farklılık gösteren fenotipik özelliklerin ve aktivitelerin (biyokimyasal özelliklerde gözlenen farklılık, örneğin ornitin dekarboksilasyonu) incelendiği biyotiplendirmede, serotiplere ait farklı biyotipleri ortaya koymak amaçlanmaktadır. Örneğin bu yöntemle, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Senftenburg gibi serotiplerin farklı biyotipleri ortaya konmuştur (282, 285-290). Ancak testler inkubasyon gibi üreme koşullarındaki değişikliklerden etkilenebilmektedir (252).

Salmonella serotiplerinin farklılıklarının ortaya konmasında kullanılan yöntemlerden biri de faj tiplendirmedir. Bakterilerin, bakteriyofajlara karşı gösterdikleri hassasiyetin değerlendirildiği bu tiplendirme yöntemi, epidemiyolojik çalışmalarda önemli bir enstrüman olarak kullanılmaktadır (291). Ancak konak hücrenin farklı bir plazmid kazanımı gibi yollar ile faj değişimi gerçekleştirebilmesi, yöntemin kullanımını zorlaştırmaktadır. Örneğin *Salmonella* Enteritidis faj tip 4’ün *incN* plazmidi kazanması durumunda faj değişimi yaşadığı ortaya konmuştur (292).

Salmonella identifikasyonunda en sık kullanılan yöntem moleküler tiplendirmedir. Elde edilen *Salmonella*’ların doğrulanması, serotip profillerinin belirlenmesi, virulens faktörlerinin ortaya konması ve plazmid analizleri yapılarak epidemiyolojik olarak önemli bir alt yapı sağlanabilmektedir (293, 294). Kromozomal DNA sekanslarının belirlenmesine ilaveten plazmid analizleri de *Salmonella* identifikasyonu ve virulens

faktörlerinin ortaya konmasında önemli rol oynamaktadır. Bu amaçla kullanılan PCR analizlerinde 16S rRNA ile ilişkili DNA sekansları hedef alınabilmektedir. Ayrıca flegella geni (*fliC*), invazyon genleri (*pagN*) veya kolonizasyon genleri (*BapA*) gibi virulans genler hedef alınabilmektedir (295-298).

2.2.4. *Salmonella* ve Konak Adaptasyonu

Salmonella serovarlarında temel olarak 3 tip konak adaptasyon modeli bulunmaktadır. *Salmonella* Pullorum veya Typhi gibi bazı serovarlar konak spesifik iken, konak spesifik olmayan veya orta dereceli konak adaptasyonu gösteren serovarlar da bulunmaktadır (255, 299). Konak spesifik *Salmonella* Typhi insanlarda oldukça şiddetli bir klinik tablo oluşturan tifoid ateş etkenidir ve hayvanlardan bulaşma ile ilgili bir kanıt bulunmamıştır. Bu sebeple özellikle su ve gıda kaynaklı *Salmonella* Typhi enfeksiyonlarının insan kontaminasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (251, 300-303).

Diğer sıcakkanlı canlılara konak adaptasyonu geliştiren ve zoonotik olan *Salmonella* serovarları da bulunmaktadır. Örneğin, *Salmonella* Dublin sığırlarda septisemiye yol açan bir patojendir. Ancak kontamine çiğ süt veya hatalı pastörizasyon durumlarında, süt ve süt ürünleri vasıtasıyla insanlara bulaşabilmektedir. Bulaştığı takdirde, *Salmonella* Dublin yüksek derecede invazyon yeteneği göstermekte hatta ölümle sonuçlanabilmektedir (304-306). Ayrıca yapılan bir çalışmada *Salmonella* Dublin'in Vi antijeni taşıdığı ortaya konmuştur (307).

Salmonella Enteritidis ve *Salmonella* Senftenberg sırasıyla tavuk ve hindilere karşı konak adaptasyonu şekillendiren serovarlardır (251). Ancak her ikisi de zoonoz karakterlidir. *Salmonella* Enteritidis, özellikle kanatlı eti, ürünleri ve yumurta tüketimine bağlı gelişen non-tifoid salmonellozis etkeni olarak halk sağlığı açısından risk oluşturan önemli bir gıda kaynaklı patojendir (299). Ayrıca *Salmonella* Cholerasuis de konak adapte bir patojen olarak insanlarda enfeksiyon şekillendirebilmektedir (308).

2.2.5. *Salmonella* Enfeksiyonlarının Patogenezi

Salmonella spp. yaklaşık 2400 patojen türüyle, halk sağlığı açısından oldukça ciddi risk teşkil eden önemli bir patojendir. *Salmonella* spp. kromozomlarının %4'ü (yaklaşık 200

gen) virulans faktörlerini kodlamaktadır (309). Bu sebeple *Salmonella* türlerine ait virulent özellikte çok sayıda tip bulunmaktadır. Özellikle plazmid ve bakteriyofaj gibi mobil genetik elementler vasıtasıyla kendilerini revize edebilmeleri, serovarların yüksek dağılım göstermesine katkı sağlamıştır (310). Virulens faktörlerinin serotip bazında gösterdiği bu dağılım neticesinde, *Salmonella* türleri bahsedildiği gibi farklı memelilerde farklı karakterde hastalık tablosu geliştirmektedir (311). Ancak tüm serovarların aynı türe affinite göstermediği bilinmektedir. *Salmonella* enfeksiyonlarının şiddeti; enfekte eden serotip, serotipin virulens özellikleri, infeksiyöz dozu, etkilenen canlı türü, konak canlıyaşı, bağışıklık durumu, mevsim ve coğrafi konum gibi birçok faktöre bağlıdır (310).

Nontifoid salmonelloziste, etken enterositlerin apikal uçlarına tutunarak dejenerasyon şekillendirmekte ve hücre içi ADP'lere riboz ekleyerek cAMP düzeyinde artış meydana getirmektedir. Böylece normalde absorpsiyon kabiliyetinde olan hücreler sekresyon yapmaya başlayarak diyareye neden olmaktadır. Sonraki safhada etken, intestinal kanalda kolonize olarak gastroenterit tablosu şekillendirmektedir (312).

Salmonella türleri invazyon kabiliyeti gösteren, fakültatif intraselüler patojenlerdir. Virülans faktörleri, mikroorganizmanın kolonize olmasını ve daha sonra hedef hücreye tutunarak invazyonunu sağlamaktadır. Ayrıca bu virulens faktörleri etkene spesifik immün mekanizmalardan kaçış ve toksin üretimi gibi özellikler kazandırmaktadır. Virülens faktörler, *Salmonella* patojenite adaları (SPA) denilen gen bölgelerinden kodlanmaktadır. *Salmonella* türleri bu adalar sayesinde dendritik hücreleri, epitel hücreleri ve makrofajları enfekte edebilmektedir (313). *Salmonella* türleri arasında SPA varlığı ve kombinasyonu farklılıklar göstermektedir. *Salmonella* türlerine ait patojenite adaları Tablo 4'de özetlenmiştir (314).

Tablo 4. *Salmonella* patojenite adalarının bazı özellikleri

	Büyüklik (kb) ^a	G+C ^a (%)	İnsersiyon Noktası	Dağılım	Virulens fonksiyonu
SPA-1	38.8	49.5	-	<i>Salmonella</i> spp.	TTSS-1, invazyon ve preinflamatuvar cevap, Fe ⁺² ve Mn ⁺² alımı
SPA-2	39.8	47.4	tRNA <i>vaIV</i>	<i>Salmonella</i> spp.	TTSS-2, intraselüler canlılığın korunması, tetrasyonat solunumu
SPA-3 (I)	17.3	47.6	tRNA <i>seIC</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Gastrointestinal kanalda canlılığın sürdürülmesi, Mg ⁺² alımı
SPA-3 (II)	10.7	54.6		subsp. I; <i>S. bongori</i>	
SPA-3 (II)	5.9	44.7		subsp. I, II	
SPA-4	23.4	44.8	tRNA-like	<i>Salmonella</i> spp.	Tip-1 sekresyon sistem, sıgır Gastrointestinal kanalında kolonizasyon
SPA-5	7.6	43.6	tRNA <i>serT</i>	<i>Salmonella</i> spp.	TTSS-1 ve TTSS-2 efektör proteinleri, enteropatojenik cevap
SPA-6	47 ^b 58.9	51.5	tRNA <i>aspV</i>	subsp. I	Saf ve Tcf Fimbriyaları
SPA-7	133.6	49.7	tRNA <i>pheU</i>	subsp. I (Bazı serovarlar)	Vi antijeni, Typhi virulensi, SopE profaj, invazyon, enteropatojenite, tip IV pilus,
SPA-8	6.8	38.1	tRNA <i>pheV</i>	subsp. I (Bazı serovarlar)	Bilinmiyor
SPA-9	16.3	56.7	profaj	Bazı serovarlar	Biofilm oluşumu, intestinal kolonizasyon
SPA-10	32.9	46.6	tRNA <i>leux</i>	subsp. I (Bazı serovarlar)	Sef Fimbriyası, kanatlılarda patojenite
SPA-11	14.0 ^c	41.3 ^c	Gifsy-1 profaj	Bilinmiyor	Makrofajlarda canlılığın korunması ve serum dirençliliği
SPA-12	6.3 ^c	49.92 ^c	tRNA <i>proL</i>	Bilinmiyor	TTSS-2 efektör proteinleri
SPA-13	19.5 ^b	48.1 ^b	tRNA <i>pheV</i>	Bilinmiyor	Kanatlılarda patojenite
SPA-14	8.7 ^b	41.4 ^b	-	Bilinmiyor	Kanatlılarda patojenite

a. Tabloda gösterilen patojenite adalarının büyüklüğü ve Guanin-Sitozin oranlarında *Salmonella* Typhi baz alınmıştır.

b. *Salmonella* Typhimurium

c. *Salmonella* Cholerasis

Bazı *Salmonella* türleri içinde korunmuş patojenite adaları bulunurken, aynı türün serotipleri arasında patojenite adaları olmayabilmektedir. Bu nedenle serotipler arasında konak adaptasyonu, patojenite ve oluşturulan enfeksiyonun şiddeti açısından farklılıklar

bulunabilmektedir (315-317). Bu patojenik özellikleri ile *Salmonella* türleri daha derin dokulara ulaşabilmektedir. İnvazyon mekanizmaları, oldukça kompleks bir yapıda olup, bakteri ve konak hücreleri arasında biyokimyasal sinyal mekanizmaların dahil olduğu bir etkileşimler bütünüdür. Bu etkileşimlerin sonucunda konak hücresinde oldukça karmaşık sinyalizasyon mekanizmaları aktive olmaktadır. Konak hücrede sitoiskelet yapıda yeniden düzenleme, hücre zarında dalgalanmalar ve bakterinin makropinositoz ile hücre içine alınması gerçekleşmektedir (318).

2.2.5.1. *Salmonella* Türlerinin Ekstraselüler Ortamdan Konak Hücrelere Geçışı

Salmonella türlerinin patogenezi incelendiğinde, etkenin intestinal kanalda derin dokulara en çok M hücreleri vasıtasıyla ulaştığı gözlenmektedir. Etken M hücreleri ile epitel dokudan lamina propriaya ve derin lenf kanallarına ulaşabilmektedir. İnvaze olduğu M hücrelerinin yapısını bozduğu bilinmektedir. İnvazyondan önce *Lpf* gen bölgesi tarafından kodlanan fimbriyaları sayesinde hücrelere tutunmaktadır. Daha sonra epitel hücrelere geçişi SPA-1 tarafından kodlanan TTSS (Trigger Three Secretory System) protein sistemi ile mümkün olmaktadır (310, 319). Bakterinin epitel hücreye invazyonu; etkenin üreme fazı, ozmolarite ve oksijen konsantrasyonu gibi çeşitli durumlardan etkilenmektedir. *Salmonella* türleri, invazyon esnasındaki değişken koşullara yine SPA-1 tarafından eksprese edilen HilA proteinini sentezleyerek adapte olabilmektedir (320). Adezin reseptör mekanizmalarını (Zipper/fermuar mekanizması) kullanan diğer invaziv patojenlerin aksine *Salmonella* türleri, ekstraselüler ortamdan hücreye invazyonda tetikleyici sistem (Trigger system) kullanmaktadır. Bu sistemde TTSS (T3SS), uygun reseptöre bağlandıktan sonra yine SPA-1 adasından kodlanan SipA, SipC, SopB, SopE ve SopE₂ gibi efektör proteinlerin yardımıyla invazyon sırasında konak hücrede aktin filamentlerini düzenleyerek invazyonamacıyla sitoiskelet yapı oluşturmaktadır (310, 321, 322). SopB proteini SPA-5 tarafından kodlanmakta ve aynı zamanda hücrede fosfotaz aktivitesini arttırarak Ca⁺² bağımlı klor kanallarını hızlandırarak sıvı sekresyonunu arttırmaktadır. Salmonellozise bağlı gelişen diyarenin gerekçelerinden birinin de bu olduğu düşünülmektedir (311). SPA-1 tarafından kodlanan proteinler ve işlevleri Tablo 5’de detaylı bir şekilde gösterilmektedir (322).

Tablo 5. SPA-1 gen bölgesi tarafından kodlanan efektör proteinler ve biyokimyasal aktiviteleri

Protein	Biyokimyasal Aktiviteleri	Bilinen <i>in vivo</i> Fonksiyonları
SipA	F-aktin stabilizasyonu, kritik konsantrasyonlarda aktin polimerizasyonunun indirgenmesi	Aktin polimerizasyonu ve düzenlenmesi
SipB	Kaspaz-1 enzime bağlanma	SPA-1 translokasyonu, Apoptozis artışı
SipC	Aktin nükleasyonu ve donatımı	Aktin polimerizasyonu
SipD	Bilinmiyor	SPA-1 translokasyonu
SlrP	Bilinmiyor	Host adaptasyon faktörü
SopA	Bilinmiyor	Enteritis şiddeti
SopB	İnositol fosfataz	Klor sekresyon artışı, aktin polimerizasyonu
SopD	Bilinmiyor	Enteritis şiddeti
SopE	Aktin düzenlenmesi	Aktin polimerizasyonu
SopE ₂	Aktin düzenlenmesi	Aktin polimerizasyonu
SptP	Aktin düzenlenmesi ve tirozin fosfataz	Oluşturulan aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi

Salmonella spp. aktin bağlayıcı proteinler sayesinde sırasıyla, (i) hücre zarında dalgalanma, (ii) mikrovillusların dejenerasyonu, (iii) hücrel protrüzyon (çıkıntı oluşumu) ve (iv) makropinositoz ile invazyon basamaklarını takip ederek kendine özgü bir invazyon mekanizması oluşturmuştur (311).

TTSS'de etken konak hücre ile ilk teması sağladığında konak hücre zarında dalgalanmalar şekillenmekte ve bu dalgalanmalar, aktin filamentlerinin çıkıntı yapmasını sağlayarak *Salmonella*'ların hücre içine internalizasyonunda kolaylık sağlamaktadır (311). Bakteri, bu yapı ile birlikte hücre zarına kademeli olarak penetre olmaktadır. SopB bu etkinliğini inositol-fosfat fosfataz enzim ile hücre zarını etkileyerek gerçekleştirmektedir. *Salmonella* türlerinin fimbriyaları, Patojen İlişkili Moleküler Patern (PAMPs) reseptörleri tarafından tanınarak, immün sistem ajanları tarafından etkene müdahale edilmesine sebep olmaktadır (322, 323).

2.2.5.2. Konak Hücrelerinde Kolonizasyon

İnvazyon işlemi tamamlandığında *Salmonella* içeren vakuoller (*Salmonella* containing vacuole-SCV) sitoplazma içinde serbestleşmektedir. *Salmonella* türleri, Alternatif Sigma Faktörleri (RpoS) gibi virulens faktörlerinin de desteği ile vakuol içinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmektedir. Vakuol içinde belirli bir sayıya ulaştıklarında hücrenin lize olmasına sebep olarak diğer konak hücrelerini enfekte etme

eğilimi göstermektedirler. *Salmonella* türleri, *Listeria* türleri gibi bulunduğu vakuolleri lize ederek sitozol içinde yaşamlarını devam ettirmezler. Bunun aksine vakuolleri dejenere etmeden intravakuoler yaşam göstermektedirler (324). Vakuollerin sitoplazma içinde serbestleşmesini müteakip SPA-2 tarafından kodlanan spiC proteinini sentezleyerek hücre tarafından vakuol içine lizozom benzeri litik enzimlerin yüklenmesi önlemektedir. SpiC konak hücresindeki Hook3 ve TassC proteinlerini hedef alarak SCV-lizozom fizyonunun önüne geçmektedir (325, 326). Böylece *Salmonella*'ların vakuol içinde yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesi mümkün olmaktadır. SCV içinde çoğalan *Salmonella*'lar daha sonra bulundukları hücreyi dejenere ederek ekstraselüler ortama yayılmaktadır (324).

Sistemik enfeksiyonların oluşumu açısından *Salmonella*'ların makrofajlarda ve M hücrelerinde varlıklarını sürdürebilmeleri önem arz etmektedir. Sistemik (Tifoid) enfeksiyonlar temelde epitel hücre invazyonundan ziyade fagositik hücreler ve submukozada bulunan M hücreleri vasıtasıyla olmaktadır (310). Tifoid enfeksiyonlara yol açan *Salmonella* Typhi, M hücreleri vasıtasıyla lamina propriyaya giriş yapmaktadır. Mukozal lenf yumrularında çoğaldıktan sonra karaciğere geçiş yapan etken, safra kesesine yerleşmekte ve düzenli olarak intestinal kanala aktarılmaktadır. Etkenin hücre zarında bulunan lipopolisakkarit yapı (LPS), hastada ateşe neden olmaktadır. Hastalığın atlatılmasından sonra asemptomatik taşıyıcılık görülebilmektedir. (327).

Enfeksiyon oluşturabilmesi için, *Salmonella* türleri nonspesifik konak savunma bariyerlerini geçerek bağırsakta kolonize olabilmeli ve invazyon ile epitel dokudan daha derin dokulara ulaşabilmelidir (310). *Salmonella*'lar konak savunmasının makro bariyerleri yanısıra, nonfagositik hücreler ve makrofajlar içinde, lizozomal enzimler ve hidrojen peroksit gibi hücresel savunma sistemleriyle de karşılaşmaktadır. Etken, bu savunma sistemlerinin aşılması için bir takım gen ekspresyonlarına ihtiyaç duymaktadır. İnvazyon genleri, nötr pH, 37°C ve yüksek ozmolariteye sahip ortamda maksimum düzeyde eksprese edilmektedir. Ayrıca SPA-1 tarafından kodlanan HilA (hyper-invasive locus) proteinleri invazyon genlerinin regülasyonunda rol oynamaktadır (316, 328, 329). *Salmonella*'lar, optimum koşullar dışında da varlıklarını sürdürebilmek için alternatif sigma faktörleri ve adaptif asit tolerans yanıtı gibi virülens faktörler geliştirmişlerdir.

2.2.5.3. Alternatif Sigma Faktörleri

Alternatif sigma faktörleri, optimum koşullar dışında bakterinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesini sağlayan önemli bir virulens özelliğidir. Bu amaçla özellikle virulens genler tarafından kodlanan çeşitli proteinler, bakterilerin konak organizmada enfeksiyon şekillendirmesinden sorumludur. Örneğin, *Salmonella enterica*'da bulunan *spv* gen bölgesi etkenin makrofajlar içinde çoğalmasını sağlayabilmektedir (330). *Salmonella* enfeksiyonlarında rol oynayan alternatif sigma faktörlerinden en önemlileri, RpoS (σ^S), RpoE(σ^E) ve FliA (σ^{28}) olarak gösterilmektedir. *Salmonella* türleri tarafından regüle edilen bu faktörler, besin madde yetersizliği, hiperozmolarite, düşük pH ve oksidatif stres gibi çevresel koşulların zorlaştığı durumlarda etkenin canlılığını korumasında yardımcı olmaktadır. Alternatif sigma faktörleri, *rpos* ve *sigB* kromozomal genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu proteinler özellikle bakterinin durağan fazda canlılığını koruyabilmesinde rol oynamaktadır (331).

2.2.5.4. Asit Tolerans Yanıtı

Gıda kaynaklı patojenlerin patogenezi etkileyen durumlardan biri de pH değişimidir. Gıdalar vasıtasıyla alınan etkenin mide asitliğini geçebilmesinin yanı sıra, asitli gıdalarda varlıklarını uzun süre koruyabilmelerini sağlayan asit tolerans yanıtı, *Salmonella*'nın epidemiyolojik olarak önemini arttıran önemli bir virulens faktördür. Normal şartlarda Gram negatif bakteriler, intraselüler pH'larını 7.6-7.8 civarında tutma eğilimindedir. Ekstrastoplazmik ortamın pH'sı düştüğü takdirde, sodyum-potasyum proton pompaları ile sitoplazmaya giren H^+ iyonları mikroorganizma tarafından aktif transport ile dışarı atılmaktadır. pH homeostatik sistem denilen bu mekanizma dışında asit şok proteinlerinin sentezlenmesi ile de pH düşüşlerine direnç geliştirebilmektedirler. Bu amaçla bir dizi gen ekspresyonu yaparak düşük pH ortamlarına adapte olmaktadır. RpoS, Phop/Q, QmpR ve Fur gibi asit şok proteinleri düşük asitliğin tolere edilmesine yardımcı olarak asit tolerans yanıtı oluşturmaktadır (332-334).

2.2.6. *Salmonella* Enfeksiyonlarında Oluşan Klinik Bulgular

2.2.6.1. Tifoid *Salmonella* Enfeksiyonları

Ülkemizde Tifo olarak bilinen Tifoid ateş, *Salmonella* Typhi'nin konak spesifik olarak insanlarda oluşturduğu, şiddetli ateşle karakterize, karın ağrısı, bradikardi, splenomegali, lökopeni, bakteriyemi, baş ağrısı, mental bozukluk gibi semptomlar şekillendiren sistematik bir enfeksiyondur (335). Hastalığın bulaşmasında insan önemli rol oynamaktadır. İnsan eliyle kontaminasyonlar neticesinde gıda ve sular da hastalığın taşınmasında etkilidir. Asemptomatik saçılımın *Salmonella* Typhi epidemiyolojisinde rolü büyüktür (299). 7-21 günlük bir inkubasyon sonrasında akut dönemde 39-40 °C'lerde seyreden yüksek ateş gözlenmektedir. Tedavi edilmediği takdirde mortalite %10 seviyelerine kadar yükselebilmektedir. Dünya çapında yılda 12-33 milyon vaka bildirilen hastalığın daha çok gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelere görüldüğü rapor edilmektedir (336, 337).

2.2.6.2. Non-Tifoid *Salmonella* Enfeksiyonları

Salmonella Typhi dışında kalan diğer *Salmonella enterica* serovarları tarafından şekillendirilen nontifoid *Salmonella* enfeksiyonları enterokolitis, diyare ve nadiren sistematik enfeksiyonlarla seyretmektedir. Etkenin alimenter yoluyla alımından itibaren birkaç saat ile gün içinde enfeksiyon başlamaktadır. Enfeksiyonun inkubasyon süresi, alınan patojenin miktarı ile direkt alakalıdır. Hastalığa; gıdalar, sular, hayvansal ürünler ve insan dışkıları kaynak teşkil etmektedir (299). Birçok enfeksiyonda olduğu gibi nontifoid *Salmonella* enfeksiyonlarında da özellikle risk grubundaki bireyler (örn., çocuklar, yaşlılar, hamileler, immunsupresif bireyler) hastalığa daha duyalıdır. Antibiyotik ile hastalık tedavi edilebilmektedir (299).

2.3. UÇUCU YAĞLAR VE ANTİMİKROBİYEL ÖZELLİKLERİ

Antibiyotiklerin mikrobiyel hastalıkların tedavisindeki yoğun kullanımı sonucu patojen mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Bu nedenle günümüzde patojenlerle mücadelede antibiyotik kullanımına alternatif yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yeni yöntemler içerisinde antibiyotik etkinlikleri ortaya konulmuş bitkisel kaynaklı doğal bileşenlerin kullanımı ve bu bileşenlere yönelik

araştırmalar ön plana çıkmaktadır (338). Gıdanın raf ömrünün uzatılabilmesi ve tüketime kadar geçen süreçte patojen mikroorganizma gelişmelerinin önlenmesi için besinlere çeşitli katkı maddeleri ilave edilebilmektedir. Kimyasal katkı maddelerinin oluşturabileceği sağlık riskleri göz önünde bulundurulduğunda, gıdalara doğal bileşenlerin ilavesi önemli bir ilgi alanı olarak dikkat çekmektedir (339, 340). Antik çağlardan bu yana et ve et ürünlerine lezzet ve aroma kazandırılması amacıyla bir çok baharat ve bitki katılmaktadır. Bu bitkiler, antimikrobiyel veya antioksidan özellikleri ile ürüne ekstra özellik sağlamaktadır (341, 342).

WHO tarafından yayınlanmış bir rapora göre (343) gelişmiş ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar endişe verici boyutlara ulaşmakta ve dünya çapında yılda iki milyona yakın insan diyarejenik hastalıklar nedeniyle ölmektedir. Bu sebeple gıda kaynaklı patojenlerin elemine edilmesinde yeni bakış açılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Alınan koruyucu önlemlerden biri de antimikrobiyel etkinlikli bitki ekstraktlarının çeşitli gıdalarda, *Salmonella* ve *E. coli* gibi gıda kaynaklı patojenlerin oluşturacağı risklerin en aza indirilmesi amacıyla kullanılmasıdır (344).

Dünya sağlık Örgütü'ne (WHO) göre 20.000 civarında bitki, tıbbi amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır (345). Doğada sık olarak rastlanabilen insani tüketime uygun birçok bitki, barındırdıkları esansiyel yağlar ile birçok patojen üzerinde gelişmeyi önleyici etkiye sahiptir (346).

Uçucu yağ, bitkilerin çiçek, tohum, yaprak gibi çeşitli kısımlarından elde edilen aromatik yağ benzeri sıvılara denilmektedir. Bitkisel uçucu yağlar; kimyasal solventler kullanılarak, kokusuz yağda bekletilerek, maserasyon yöntemiyle veya buhar distilasyonu gibi çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilebilmektedir. Buhar distilasyonu, bitkilerden uçucu yağ eldesinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Üç binin üzerinde bilinen uçucu yağ bulunmaktadır ve bunların 300'e yakını ticari öneme sahiptir (347).

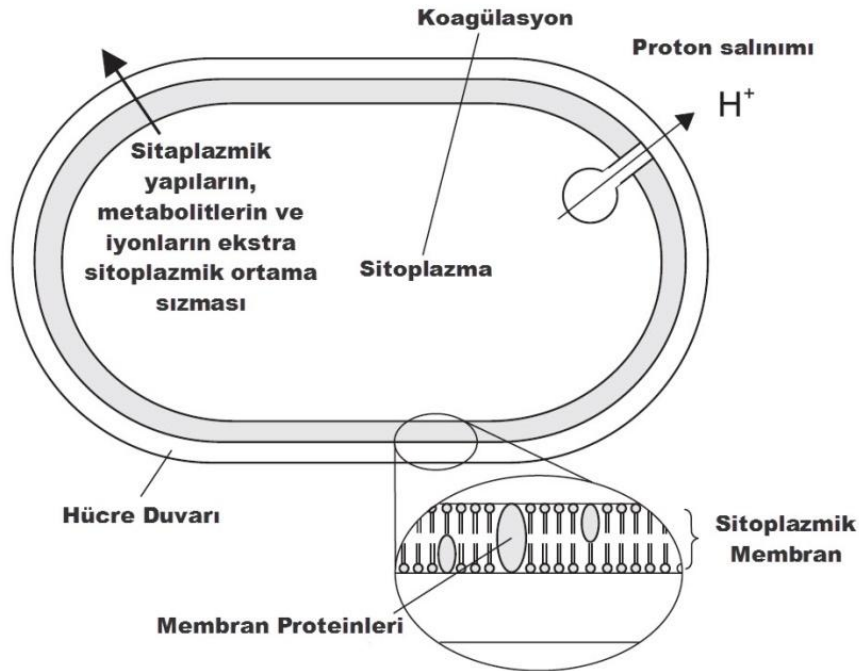
Uçucu yağların antimikrobiyel etkinlikleri uzun zamandan beri bilinmektedir (348). Bitkisel uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri, büyük ölçüde içerdikleri fenolik bileşiklerin kompozisyonu ile ilişkilidir (349). Uçucu yağların veya komponentlerin antimikrobiyel etkinliklerinin (350) yanı sıra antiviral (351), antimikotik (352), antitoksijenik (353), antiparazitik (354) ve insektisidal (355) özellikleri rapor edilmiştir.

Bitkiden elde edilen bileşiğin farklı özellikler göstermesi, bileşiğin kimyasal profili ve fonksiyonu ile ilişkilidir (356).

Günümüzde uçucu yağlar sıklıkla gıdalarda aroma verici olarak, parfüm üretiminde ve kendilerine has özellikleri dolayısıyla çeşitli farmasötik amaçlar için kullanılmaktadır (347, 357). İlaveten diş tedavisinde (358), genel amaçlı antiseptik olarak (359) ve yem katkı maddesi (360) gibi çok farklı şekilde de kullanıma sunulmaktadır.

2.3.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları

Birçok çalışmada antimikrobiyel etkinlikleri kanıtlanmış olmasına rağmen, bitkisel uçucu yağların mikroorganizmaları hangi mekanizmalar ile etkiledikleri tam olarak bilinmemektedir (361). Uçucu yağların tek bir mekanizma ile antimikrobiyel etkinlik oluşturmadıkları bilinmektedir. Spesifik mekanizmalarında hedef aldıkları belli başlı hücresel yapılar bulunmaktadır (362, 363). Esansiyel yağların mikroorganizmalarda şekillendirdikleri değişiklikler ve hedef bölgeleri Şekil 5’de gösterilmiştir (344).



Şekil 5. Uçucu yağların mikroorganizmalar üzerindeki hedef bölgeleri ve antimikrobiyel etki mekanizmaları

Uçucu yağların antimikrobiyel etki mekanizmalarının her biri ayrı ayrı etkili olabileceği gibi spesifik hedef bölgeleri birden fazla komponent etkileyebilmektedir (344). Esansiyel yağların antimikrobiyel etkinlik sağlamalarına yardımcı olan önemli özelliklerinden biri hidrofobik yapıda olmalarıdır. Bu özellik sayesinde uçucu yağlar, bakteriyel hücre membranındaki yapıların işlevini etkileyerek hücrenin permeabilitesini bozmaktadır (364). Böylece sitoplazmik yapılar, metabolitler ve çeşitli iyonlar istemsiz olarak hücre dışına sızmak suretiyle hücrede depresyon şekillenmektedir (359, 365). Hücresel yapıların kaybı, hücre tarafından tolere edilip viabilite sürdürülebildiği gibi kritik moleküller ve iyonların kaybı ile hücre ölüm de şekillenebilmektedir. Örneğin, çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) uçucu yağının *E. coli* üzerine antimikrobiyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada lizis şekillenmeden *E. coli* hücrelerinin viabilitelerini kaybettiği ortaya konmuştur (366).

Karvakrol, ögenol, timol gibi fenolik bileşikler, uçucu yağların antimikrobiyel etkinlik göstermelerinde çok önemli rol oynamaktadırlar (365, 367, 368). Fenolik bileşiklerin etki mekanizmalarının aşağı yukarı aynı olduğu düşünülmektedir. Etki ettikleri bakteri hücresinin sitoplazmik membranında bozukluklar şekillendirerek protein hareket gücü ile (Protein Motive Force: PMF) elektron akışına ve hücre içeriğinde koagülasyona yol açmaktadır (369, 370).

Esansiyel yağların *Bacillus cereus* üzerine antimikrobiyel etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada (371) karvakrolün hücre membranında yer alan fosfolipid tabakayı etkileyerek hücre membranı stabilitesini bozduğu ileri sürülmüştür. Hedef bakteri hücresinde, daha akışkan bir yapıya dönüşmüş olan membranın permeabilitesinde artış şekillendiği ortaya konmuştur (371).

Ultee ve Smid tarafından yapılan bir çalışmada (353) patojenlerin vejetatif formlarının inhibisyonunun yanı sıra toksin üretiminin de baskılanması amaç olarak gösterilmiş, karvakrolün *Bacillus cereus*'ların toksin üretimini de inhibe ettiği ortaya konmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada (368) fenolik bileşiğe asetat ilavesi ile antimikrobiyel aktivitenin artış gösterdiği rapor edilmiştir. Sadece fenolik bileşikler değil aynı zamanda uçucu yağların alkil grupları da antimikrobiyel etkinliklerini etkilemektedir. Örneğin limonenin (1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene) p-simenden daha etkili olduğu ortaya konmuştur (368).

Uçucu yağ bileşenlerinin bir diğer etki mekanizması da bakteri hücresinin sitoplazmik membranına gömülü proteinleri etkilemeleridir (372). Sitoplazmik membranda, lipid yapılara komşu olarak bulunan ATPaz enzimi, uçucu yağların yapısında bulunan siklik hidrokarbonlar ile iki temel mekanizma ile etkileşime geçmektedir. Lipofilik hidrokarbon molekülleri, membran lipid tabakasında birikerek membrandaki lipid protein interaksyonunu bozabilmektedir. Bir diğer etki mekanizması ise lipofilik tabakaları direkt olarak etkileyerek amfipatik lipid yapısının bozulmasına yol açmalarıdır (370, 373). Belirtilen antimikrobiyel etki mekanizmalarının yanı sıra farklı esansiyel yağların daha spesifik etki mekanizmaları da vardır. Örneğin, tarçın yağının ve bileşenlerinin *Enterobacter areogenes*'de aminoasit dekarboksilaz yetersizliğine yol açarak antimikrobiyel aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (374).

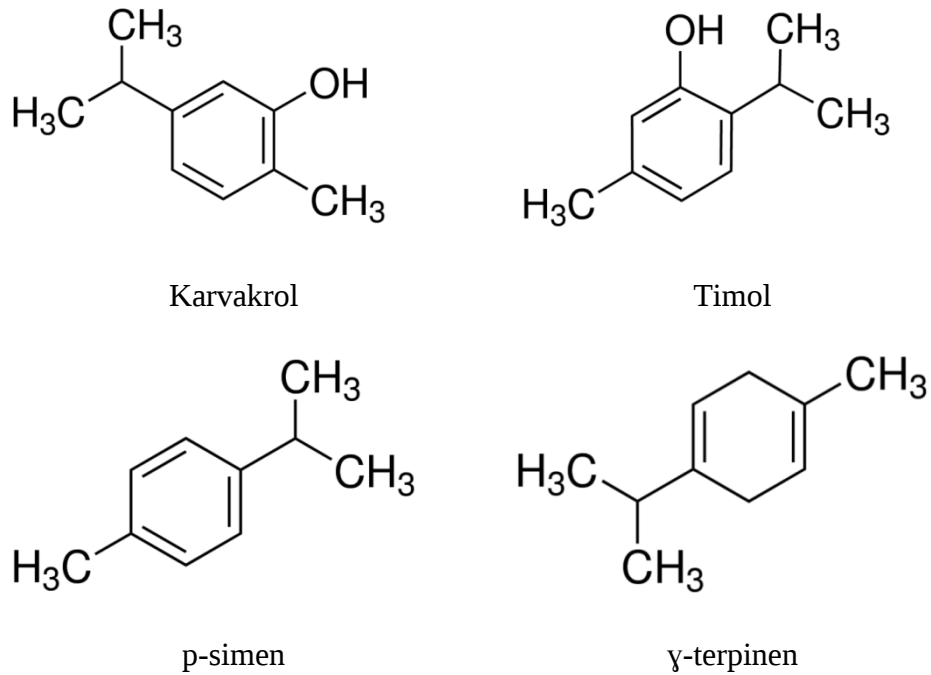
2.3.2. Zahter (*Thymbra spicata* L. Subsp. *spicata*) Uçucu Yağı

Türkiye bitki florasında Lamiaceae (Labiatae) ailesine mensup *Thymus* (57 takson), *Satureja* (14 takson), *Thymbra* (4 takson) ve *Coridothymus* (1 tür) cinsleri bulunmaktadır. Anılan cinslerin ortak özellikleri, uçucu yağ ana bileşenlerinin genellikle karvakrol, timol ya da her ikisini de içermesidir (18). Benzer kokularından dolayı bu türlere Türkiye'de kekik adı verilmektedir. *Thymbra*'nın Türkiye'de bulunan taksonları; *Thymbra spicata* subsp. *spicata*, *Thymbra spicata* subsp. *intricata*, *Thymbra sintenisii* subsp. *sintenisii* ve *Thymbra sintenisii* subsp. *isaurica*'dır (375). Bunlardan en bilineni zahter, *Thimbra spicata* subsp. *spicata*, Yunanistan, Kuzey Kıbrıs Türkiye Cumhuriyeti, Suriye, Tunus, Lübnan, İsrail, Ürdün, İran ve Irak'ta yayılım gösteren ve Türkiye'de de başta Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu olmak üzere, tüm bölgelerde yaygın olarak mutfaklarda beğeni ile kullanılan bir bitkidir (376-378).

Dik gövdeli, yıllık bitki olan *Thymbra spicata* L.subsp. *spicata*; yaklaşık 16-36 cm boylarında olup toprağa yakın kısmı odunsu bir yapıdadır (376). Basit çatallı bir dallanma gösteren zahterin yaprak yapısı linear ve linear-lanseolat olarak tanımlanır. Yaprak orta damarı üst yüzde değil alt yüzde daha belirgindir (379).

Zahterin uçucu yağ kompozisyonunda karvakrol veya timol büyük role sahiptir (18). Lamiaceae (Labiatae) ailesine mensup bitkiler sahip oldukları bu derivatların kimyasal ve fizyolojik özellikleri dolayısıyla başta gıda ürünlerinde olmak üzere, antimikrobiyel ve antiseptik olarak bazı ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır (21). Zahter uçucu

yağında karvakrol dışında, p-simen ve γ-terpinen esansiyel yağları da yoğun olarak bulunmaktadır. Esansiyel yağ kompozisyonu, iklimik, mevsimsel ve coğrafi farklılıklar, toplanma zamanı, distilasyon farklılıkları gibi nedenlerle değişkenlik göstermektedir (21). Esansiyel yağların katıldıkları gıdalarda antibakteriyel ve antifungal etkinlikleri, bileşen kompozisyonu, ekstraktın konsantrasyonu, gördüğü işlemler, saklama koşulları ve etki etmesi istenilen mikroorganizmanın karakteri gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (381-383).



Şekil 6. *Thimbra spicata* 'nın içerdiği bazı uçucu yağların kimyasal yapıları

Kekik ve türevleri, Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkiler içinde defne yaprağından sonra yıllık 9.683 ton ile en çok ihracatı yapılan ürünlerin başında gelmektedir. Doğadan toplanan zahterin tüketimi çoğunlukla iç piyasada yapılmakla birlikte, gerek baharat gerekse de uçucu yağ olarak yurt dışına da satılmaktadır (384).

Doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından 1/3'ü uçucu yağ içermektedir. Bitkisel uçucu yağlar uzun yıllardan beri kozmetik, ilaç, aromaterapi, fitoterapi ve gıda sanayii gibi bilimsel ve ticari birçok alanda kullanılmaktadır (385). Uçucu yağlar, oda sıcaklığında sıvı halde olup, kolay kristalleşebilir tabiatta, kuvvetli kokulu, suda çözünmez, yağimsı karışımlardır (338). Bunlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabilmelerinden dolayı uçucu yağ olarak adlandırılmaktadır. Uçucu yağların

bitkilerden saf olarak elde edilip amacına uygun olarak kullanılması, ekonomik ve etkili bir yaklaşımdır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlarda 2000'den fazla kimyasal bileşen olabileceği ortaya konmuş ve bu maddelerin birbirinden farklı fizyolojik etkileri nedeniyle tek yahut kombine halde birçok amaçla kullanılmaya başlanmıştır (338).

Belirtilen tıbbi özellikleri sebebiyle, *T. spicata* L.subsp. *spicata* türü; çeşitli mide ağrıları, diyabet, soğuk algınlığı gibi rahatsızlıklar başta olmak üzere, antiseptik olarak ve sindirim kanalı parazitlerine karşı kullanılan bir bitki türüdür. *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*'nın uçucu yağ kompozisyonunun ve antifungal, antibakteriyel özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada (22) uçucu yağın özellikle de karvakrolün araştırılan mikroorganizmalar üzerinde kuvvetli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada (377) ise *Thimbra spicata* subsp. *spicata* ekstaktının *S. aureus* ve *Salmonella* Typhimurium üzerinde antimikrobiyel etkinlik gösterdiği ortaya konmuştur.

Bitki ekstraktları tarafından gösterilen antimikrobiyel aktivitenin, terpenoidler (karvakrol, karvon, timol, terpinenler) ve fenilpropanoidler (sinnemaldehid, ögenol, anethol) gibi ikincil bitki bileşenlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Esansiyel yağların hidrofobik özelliklerinden dolayı bakteri hücre duvarının geçirgenliğini arttırarak hücreyi parçaladığı bildirilmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda esansiyel yağ bileşiklerinden karvakrol, timol, ögenol, perilaldehit, sinnamaldehit ve sinnamik asitin bazı bakteri türlerine (*S.Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. dysenteria*, *B. cereus* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel etkisi belirlenmiştir (344).

Özellikle *E. coli* ve *Salmonella* Typhimurium gibi patojenlerin oluşturdukları riskler göz önüne alındığında sıklıkla tüketilen geleneksel bir gıda olan fermente sucuklarda yüksek oranda terpenoid içerdiği bilinen zahter uçucu yağının antimikrobiyel amaçlı kullanımının değerlendirilmesi, gıda teknolojisine farklı bir yaklaşım getirebilecek niteliktedir. Dolayısıyla bu çalışmada fermente Türk sucuklarında, farklı oranlarda zahter uçucu yağının (300 ve 500 ppm) *E. coli* ve *Salmonella* Typhimurium üzerine antimikrobiyel etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Standart Suşlar

Çalışmada kullanılan *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7 (NCTC 12900), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *L. monocytogenes* (N 7144), *S. aureus* (ATCC 25923) referans suşları, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarından temin edildi. Deneysel fermente sucuk üretiminde *Staphylococcus carnosus* ve *Lactobacillus sakei* liyofilize starter kültürler içeren Chr-Hansen, Bactoferm F-RM-52 marka ticari preparat kullanıldı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1. Blood Agar (Merck 1.10886)

Bileşim;

Nutrient substrate (heart extract and peptones; kalp ekstraktı ve peptonlar) 20.0 g/L

NaCl 5.0 g/L

Agar-agar 15.0 g/L

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri 40.0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında sıcaklığı 50 °C’ye düşürülen besiyerine %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi. Homojenize edildikten sonra petri kutularına döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılincaya kadar +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.2.2. Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)

Bileşim;

Meat infusion 2.0 g/L

Casein hydrolysate 17.5 g/L

Starch 1.5 g/L

Agar-agar 13.0 g/L

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri 34.0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra otoklavda 115 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında sıcaklığı 50 °C'ye düşürülen besiyeri petri kutularına döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.3. Brain-Heart Broth (Merck 1.10493)

Bileşim;

Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27.5 g/L

D(+) Glucose 2.0 g/L

NaCl 5.0 g/L

Na₂HPO₄ 2.5 g/L

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri, 37.0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Kullanılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.4. Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck 1.12535)

Bileşim;

Peptone 1.0 g/L

NaCl 8.5 g/L

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri 9.5 g tartılarak 1 L distile su ile otoklavlanabilir cam şişelerde homojenize edildi. Desimal dilüsyonlar için deney tüplerine 9 mL, sucukların homojenizasyonu için ise cam şişelere 90 ml aktararak 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi. Hazır hâldeki berrak ve renksiz çözelti kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.5. MacConkey Agar (Merck 1.05465)

Bileşim;

Peptone from casein 17.0 g/L

Peptone from meat 3.0 g/L

NaCl 5.0 g/L

Lactose 10.0 g/L

Bile saltmixture 1.5 g/L

Neutral red 0.03 g/L

Crystal violet 0.001 g/L

Agar-agar 13.5 g/L

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri 50.0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında sıcaklığı 50 °C'ye düşürülen besiyeri petri kutularına döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.6. XLD Agar (Merck 1.05287)

Bileşim;

Yeast extract 3.0 g/L

NaCl 5.0 g/L

D(+) Xylose 3.75 g/L

Lactose 7.5 g/L

Sucrose 7.5 g/L; L(+)

Lysine 5.0 g/L

Sodium deoxycholate 1.0 g/L

Sodium thiosulfate 6.8 g/L

Ammonium iron(III) citrate 0.8 g/L

Phenol red 0.08 g/L

Agar-agar 14.5 g/L

Hazırlanışı; 500 mL distile su içine 55.0 g/L olacak şekilde dehidre besiyeri ilave edildi. Topaklanma giderilene kadar manyetik karıştırıcı (Velp, Are) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutuldu ve sıcaklığı 50 °C'ye düşürülen besiyeri petri kutularına dökülerek ve donmaya bırakıldı. Kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.7. De Man Rogosa Sharp Agar (MRSA, Merck 1.10660)

Bileşim;

Peptone from casein 10.0 g/L

Meat extract 10.0 g/L

Yeast extract 4.0 g/L

D(+) Glucose 20.0 g/L

K₂HPO₄ 2.0 g/L

Tween 80 1.0 g/L

di-Ammonium hydrogen citrate 2.0 g/L

Sodium acetate 5.0 g/L

MgSO₄ 0.2 g/L

MnSO₄ 0.04 g/L

Agar-agar 14.0 g/L.

Hazırlanışı; Dehidre besiyeri 68.2 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında sıcaklığı 50 °C'ye düşürülen besiyeri petri kutularına döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.8. Baird Parker Agar (Merck 1.05406)

Bileşim;

Peptone from casein 10.0 g/L

Meat extract 5.0 g/L

Yeast extract 1.0 g/L

Sodium pyruvate 10.0 g/L

Glycine 12.0 g/L

Lithium chloride 5.0 g/L

Agar-agar 15.0 g/L.

Hazırlanışı; 58.0 g dehidre besiyeri 950 mL distile su içindemanyetik karıştırıcı (Velp, Are) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında sıcaklığı 50 °C'ye düşürülen besiyerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL Egg Yolk Tellurite (Merck 1.03785) ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra petri kutularına döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.3. Sucuk Üretiminde Kullanılan Hammadde

Sucuk üretiminde kullanılacak olan sığır eti ve yağı Saray Çiftliği perakende satış ofisinden, sucuk baharatları ise Bağdat Baharat A.Ş.'den temin edildi. Çalışmada deneysel sucuk üretimi için Tekinşen ve Doğruer (386) tarafından belirtilen sucuk karışımı modifiye edilerek Tablo 6'da belirtilen şekilde kullanıldı.

Tablo 6. Deneysel sucuk hamur karışımının bileşimi

Unsur	Miktar (kg)
Sığır eti	88.0
Kuyruk yağı	12.0
Tuz	2.2
NaNO ₂	0.015
Şeker	0.5
Sarımsak	1.5
Acı kırmızı biber	0.5
Tatlı kırmızı biber	1.0
Kara biber	0.5
Kimyon	1.5
Yenibahar	0.6

3.2. YÖNTEM

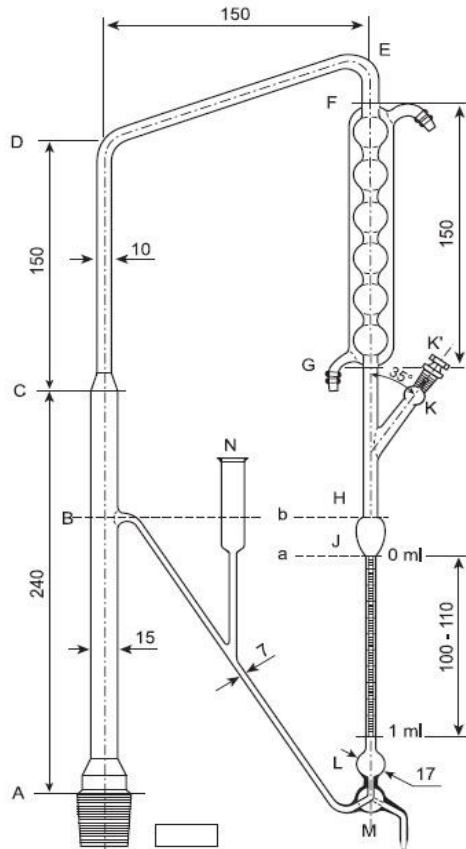
3.2.1. Zahter Bitkisinin Temini ve İdentifikasyonu

Zahter (*Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*) bitkisi Mayıs-Temmuz 2015 tarihleri arasında Kilis ili kırsalından toplandı. Zahterin çiçekli formları uygun şekilde kurutularak, bitkinin identifikasyonu için hazır hale getirildi. Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü, Botanik Anabilim Dalı öğretim Üyesi Doç. Dr. Cem Vural tarafından incelenen bitki, Lamiaceae familyasından *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* olarak tanımlanarak doğrulandı. Bitkilerin yaprak kısmı uçucu yağ ekstaksiyonu için 30 °C'de 7 gün kurutma işlemine tabi tutuldu. Kurutulan bitkiler parçalayıcıda toz haline getirilerek cleveger düzeneği ile uçucu yağlarının çıkarılması için uygun bir şekilde hazırlandıktan sonra ağzı kapalı koyu cam şişede oda sıcaklığında ekstraksiyon işlemine kadar muhafaza edildi.

3.2.2. Zahterin Uçucu Yağ Ekstraksiyonu ve Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

Bitkinin kurutulması ve öğütücü ile toz haline getirilmesi sonrası uçucu yağ eldesi için ekstraksiyon işlemine geçildi. Bu amaçla European Pharmacopoeia 5.0 (2005)'da tarif edilen Clevenger aparatı kullanıldı (387). Aparatın balon kısmına konulan 50 g toz hale getirilmiş zahter, 500 ml distile su eklenerek mantolu balon ısıtıcı yardımı ile kaynatıldı. İşlem esnasında uçucu yağın, buhar vasıtasıyla soğutucu bölüme ulaştıktan sonra damıtık su ile birlikte aparatın toplama haznesinde biriktiği gözlemlendi. Yaklaşık olarak 3 saat süren hidrodistilasyon sonrasında uçucu yağ verimi yüzde (%) olarak belirlendi. Elde edilen ekstrakt, kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi ve çalışmada kullanılması için karanlık tüplere konularak ve +4 °C'de muhafaza edildi.

Zahter'den elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla 5 ml numune, şahitli olarak TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'ne gönderildi. Uçucu yağın, Headspace Gaz Kromatografi-Kütle Kromatografisi (GC-MS) ile kalitatif analizi, kurumun ilgili birimi tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 7. Uçucu yağ ekstraksiyonunda kullanılan cam Clevenger aparatı (Uzunluklar mm olarak verilmiştir.)

3.2.3. Zahter Uçucu Yağının Antimikrobiyel Etkinliğinin *in vitro* Ortamda Belirlenmesi

Thymbra spicata L. subsp. *spicata* uçucu yağının; *S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* referans suşları üzerinde antimikrobiyel etkinliğinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanıldı.

3.2.3.1. Antimikrobiyel Etkinliğin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Steril serum fizyolojik içinde 0.5 Mcfarland dansitede hazırlanmış bakteri süspansiyonları, kanlı agar (Merck 1.10886) ve Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437) üzerine yayma plak yöntemi ile ekildi. Önceden hazırlanmış steril filtre kağıtlarına (5 mm çapında Whatman No 1.) 50 µl saf uçucu yağ emdirildi ve yayma plak ile ekim yapılmış petrilere konuldu. Oluşacak inhibisyon zonlarının daha sağlıklı belirlenmesi amacıyla her petriye ayrıca, Gentamisin (Oxoid, CT0695, 200ug) diskleri ve 50 µl steril distile su emdirilmiş filtre kağıtları konuldu. Petriler 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonları ölçüldü.

3.2.3.2. Broth Mikrodilüsyon ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonun (MIC Değeri) Belirlenmesi

Zahter uçucu yağının *S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine göstermiş olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIC değeri) belirlenmesi amacıyla Dussault ve ark. (2014) tarafından tarif edilmiş olan Broth mikrodilüsyon testi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı (388). Bu amaçla düz tabanlı 96 kuyucuklu ELISA plakası kullanıldı. MIC analizi için ekstrakt, %5 Tween 20 içeren distile su ile %2.5 (w/w) oranında sulandırıldı. ELISA plakasının 1. kuyusuna 200 µl; 2-12. kuyularının her birine ise 150 µl Brain-Heart Broth (Merck 1.10493) konuldu. Hazırlanmış olan %2.5’luk stok solusyondan 58 µl alınarak 1. kuyuya eklendi ve 11. kuyuya kadar desimal dilüsyonları konuldu. Uçucu yağ ilave edilmemiş 12. kuyu bakteri üremesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak değerlendirildi. Daha sonra her bir kuyuya önceden hazırlanmış olan 0.5 Macfarland düzeyindeki bakteri süspansiyonundan 15 µl konularak, plaka 37 °C’de 1 gün inkübe edildi. Her bir bakteri için ayrı ayrı tek kullanımlık aseptik ELISA plakası kullanıldı. İnkubasyondan sonra bütün kuyulara 15 µl Iodonitrotetrazolium Choloride (%70’lik etil

alkolde 0.5 mg/ml olacak şekilde) eklendi ve 37 °C’de 60 dakika olmak üzere tekrar inkübe edildi. İnkubasyondan sonra üremenin şekillendiği kuyularda saydam renk, mor-menekşe bir hal aldı. Analizin son basamağında plakalar ELISA okuyucuda 540 nm dalga boyunda negatif türbiditeye karşı okutularak çalışmada elde edilmiş olan zahter uçucu yağının *S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* üzerine göstermiş olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC değeri) mg mL⁻¹ olarak belirlendi.

3.2.3. Deneysel Sucuk Üretimi

Ticari starter kültür ilave edilen sucuk hamuru kıyma makinesinde (1.3-2.5 cm ayna çaplı) karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha sonra gruplarda belirtilen miktarlarda uçucu yağ ve patojen mikroorganizmalar ilave edilen sucuk hamuru, bir gün +4 °C’de 24 °C’de dinlendirildikten sonra sucuk dolum makinası ile sentetik kılıflara dolduruldu.

Tüm gruplar iklimatik kabinde; %95 bağıl nem ve 22±2 °C’de 1 gün, %90 bağıl nem ve 22±2 °C’de 2 gün, %83 bağıl nem ve 22±2 °C’de 1 gün ve son olarak %80 bağıl nem ve 18±2 °C’de 2 gün olmak üzere toplam 6 günde olgunlaştırıldı. Olgunlaştırma işleminden sonra tüm sucuklar +4 °C’de muhafaza edildi.

3.2.4. Deneysel Sucuk Örneklerinin Gruplandırılması

Zahterin sucuğa katılmasını konu alan çalışmalarda söz konusu bitki ekstraktının sucuğa 150-1500 ppm düzeylerinde katıldığı belirlenmiştir (27, 389). Bu çalışmada da kullanılan zahter (*Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*) bitki ekstraktı fermente sucuğa 300 ve 500 ppm olmak üzere iki farklı düzeyde katılarak deneysel gruplar oluşturuldu. Çalışmada deneysel olarak yapılan sucukların gruplandırılması Tablo 7’deki gibidir.

Tablo 7. Çalışmada oluşturulan deney grupları

Gruplar	Katılan Bitki ekstraktı miktarı	İnoküle edilen Patojen
Grup 1	300 ppm	<i>E. coli</i>
Grup 2	500 ppm	<i>E. coli</i>
Grup 3	-	<i>E. coli</i>
Grup 4	300 ppm	<i>S. Typhimurium</i>
Grup 5	500 ppm	<i>S. Typhimurium</i>
Grup 6	-	<i>S. Typhimurium</i>

-: Uygulanmadı

3.2.5. Mikrobiyolojik Analizler

Deneysel olarak hazırlanan sucuk gruplarından sucuk hamurunun sentetik kılıflara doldurulmasından itibaren 0, 1, 3, 6, 10, 15, 30. günlerinde mikrobiyolojik analizler yapılarak kayıt altına aldı. Bu amaçla sucuk örneklerinden 10 g alınarak, içinde 90 mL Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck 1.12535) bulunan stomacher poşetlerine aktarıldı ve stomacherde (BagMixer Stomacher® 400P, Fransa) 2 dakika süreyle homojenize edildi. Dokuzar mL'lik MRD kullanılarak hazırlanan uygun seyreltilerden, yayma plak yöntemiyle selektif besiyerlerine ekim yapıldı. *E. coli* sayımı için MacConkey Agar (Merck 1.05465) üzerine ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonucu büyük, kırmızı renkli, etrafı hafif bulanık zon ile çevrili koloniler sayıldı. *S. Typhimurium* için XLD agara (Merck 1.05287) ekim yapıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek, parlak siyah renkli koloniler sayıldı. Mikrokok/Stafilokoksayımı için Egg Yolk Tellurite (Merck 1.03785) ilaveli Baird Parker Agar'a (Merck 1.05406) ekim yapıp 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. LAB sayımı için ise Man Rogosa Sharp Agar'a (Merck 1.10660) ekim yapıldı ve anaerob koşullarda 30 °C'da 72 saat inkübe edildi (390).

3.2.6. Sucuklarda Kimyasal Analizler

Sucuk gruplarından 0, 1, 3, 6, 10, 15, 30. günlerde pH ve Kuru madde (KM) değerleri belirlenerek kayıt altına aldı.

3.2.6.1. pH Değerinin Belirlenmesi

Sucuk örneği 10 g tartıldıktan sonra üzerine 100 ml saf su ilave edilerek homojenize edildi ve karışımın pH'sı Inolab (Level 2) marka pH metre kullanılarak ölçüldü (391).

3.2.6.2. Kuru Madde (KM) Oranının Belirlenmesi

KM oranının belirlenmesi amacıyla boş porselen krozeler, 105 °C'de en az iki saat tutularak sabit ağırlığa getirildi ve sonra desikatöre alınıp oda sıcaklığına soğutuldu. Hassas terazide darası alınan krozelere yaklaşık 5 g örnek koyularak ilk tartım (a) yapıldı. Örnekler 105 °C'de yaklaşık 18 saat süreyle, sabit ağırlık elde edilinceye kadar kurutuldu ve desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra ikinci tartım (b) yapıldı. Örnekteki kuru madde oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (391).

$$\% \text{ Kuru madde} = (b/a) \times 100$$

a: İlk Tartım (g)

b: İkinci Tartım (g)

3.2.6.3. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Tayini

Homojenize edilmiş 10 g sucuk örneği tartılarak Kjeldahl cihazının tüplerine aktarıldı. Daha sonra örneğin üzerine 97,5 ml distile su ve 2,5ml (1:2)'lik HCl (Merck 1.09057) çözeltisi ilave edilerek distilasyon işlemine geçildi ve 200 ml distilat elde edilinceye kadar işlem sürdürüldü. Distilasyonun ardından elde edilen ürün karıştırılarak 5 ml'si deney tüpüne yerleştirildi, Üzerine 5 ml TBA reaktifi (Merck) ilave edilerek tüpün kapağı kapatılıp çalkalandı. Negatif kontrol için ise bir başka deney tüpüne 5 ml TBA reaktifi ve 5 ml distile su ilave edilerek yine vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpler kaynayan su banyosunda 35 dakika tutulup, soğutuldu. Son olarak örneklerin optik dansitesi spektrofotometrik olarak (Uviline, 8100) 538 nm dalga boyunda negatif kontrole karşı okundu. Elde edilen dansite değeri 7,8 ile çarpılarak 1000 g örnekteki mevcut malonaldehit miktarı mg olarak saptandı (392).

3.2.7. Organoleptik Analiz

Çalışmada uçucu yağ ilaveli sucuk gruplarının organoleptik muayenesi, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim üyelerinden oluşan panelistler tarafından Tablo 8'de belirtilen duyu analizi formu değerlendirilerek yapıldı. Panelistlere; uçucu yağ içermeyen sucuk, 300 ppm düzeyinde uçucu yağ katılmış sucuk ve 500 ppm düzeyinde uçucu yağ ilave edilmiş sucuk örneği olmak üzere toplamda 3 adet farklı formülasyonda sucuk örneği sunuldu.

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza sürelerindeki *E. coli*, *S. Typhimurium* Mikrokok-Stafilokok ve LAB düzeyleri (log kob/gr) ve pH, KM (%) gibi kimyasal faktörlere ilişkin istatistik önem kontrolü, tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile test edildi. Organoleptik muayene sonucunda anket sonuçlarının değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farklılığın önem kontrolü Kruskal Wallis testi ve ikili karşılaştırmalar

Benferroni düzeltmesi uygulandıktan sonra Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Bitkiden elde edilen uçucu yağ oranlarının ve sucuklardaki başlangıç mikrobiyolojik yüklerinin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Çalışma kapsamındaki istatistik analizler SPSS 14.01 paket programı ile yapıldı. Elde edilen sonuçların özet istatistik sonuçları ve oransal dağılımları tablolar vasıtasıyla gösterildi. Çalışmada yapılan analizlerin tamamı çift paralel, üç tekrar olarak gerçekleştirildi.

Tablo 8. Panelistler tarafından doldurulan sucuk duyuusal analiz formu

Sucuk Duyusal Analiz Formu				
				Panelist Numarası:
Sayın panelist,				
Size, toplam 3 (üç) adet farklı formülasyonlar ile hazırlanmış sucuk örneği sunulacaktır. Lütfen sucuk örneklerini formda size sunulan sırayla inceleyiniz. Sucukların özellikleri hakkındaki düşüncelerinizi işaretlemek için kutucuklardan birine çarpı işareti (X) koymanız yeterli olacaktır.				
SUCUK ÖRNEĞİNİN NUMARASI:				
1. Sucuk örneğinin RENGİNİ inceleyip, düşüncenizi işaretleyiniz.				
Çok Kötü ☐	Kötü ☐	Orta ☐	İyi ☐	Çok İyi ☐
2. Sucuk örneğinin KOKUSUNU inceleyip, düşüncenizi işaretleyiniz.				
Çok Kötü ☐	Kötü ☐	Orta ☐	İyi ☐	Çok İyi ☐
3. Sucuk örneğinin KIVAMINI (çiğnenebilirliği) inceleyip, düşüncenizi işaretleyiniz.				
Çok Kötü ☐	Kötü ☐	Orta ☐	İyi ☐	Çok İyi ☐
4. Sucuk örneği ile ilgili olarak LEZZETİ (tadı ve aroması) hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.				
Çok Kötü ☐	Kötü ☐	Orta ☐	İyi ☐	Çok İyi ☐
5. Sucuk örneği ile ilgili olarak GENEL BEĞENİNİZİ hakkındaki düşüncenizi işaretleyiniz.				
Çok Kötü ☐	Kötü ☐	Orta ☐	İyi ☐	Çok İyi ☐

4. BULGULAR

4.1. *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* Uçucu Yağının Eldesi ve Hidrodistilasyon Verimliliği

Thymbra spicata L. subsp. *spicata* bitkisinden Clevenger hidrodistilasyon yöntemi ile hoş kokulu, açık sarı renkli bir uçucu yağ elde edildi. Çalışmada $62,59 \pm 7,633$ g bitkiden ortalama $1,51 \pm 0,282$ mL (%2.41) uçucu yağ ekstrakte edildi. Uçucu yağın verimliliği Tablo 9’da gösterilmiştir.



Şekil 8. Clevenger aparatı ve *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* uçucu yağı

Tablo 9. Çalışmada elde edilen uçucu yağ ekstraksiyon verimliliği

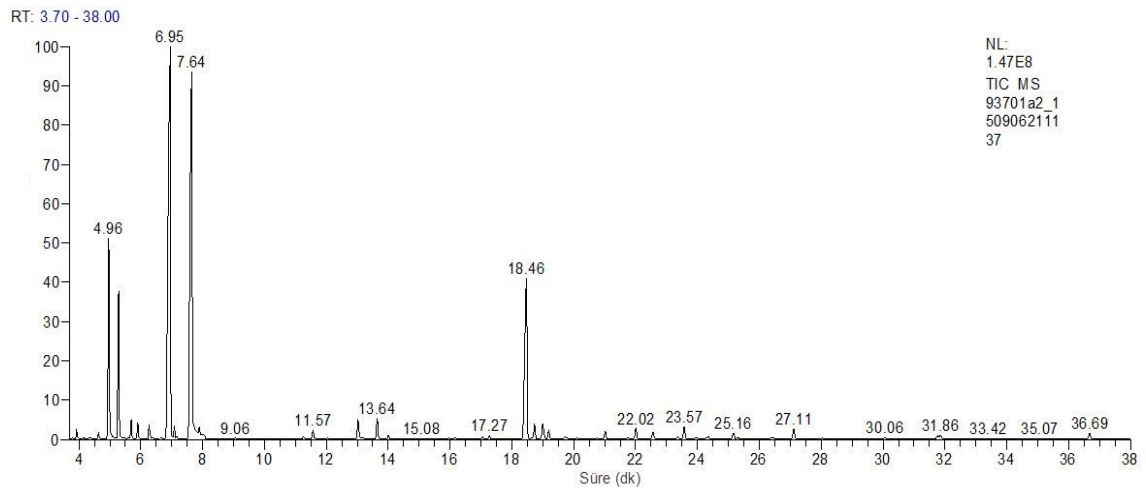
	Min	Maks	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
Kullanılan Bitki (g)	50,11	72,29	62,59±7,633
Elde edilen Uçucu yağ (mL)	1,12	1,85	1,51±0,282

Ekstraksiyon Sayısı: 27

Min: Minimum değer, Maks: Maksimum değer; Verimlilik: %2.41

4.2. Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Kompozisyonu

Thymbra spicata L. subsp. *spicata* bitkisinin uçucu yağ kompozisyonunun kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla Marmara Araştırma Merkezi tarafından GC-MS tekniği (TÜBİTAK) gerçekleştirildi. Analiz neticesinde ortaya çıkan kromatografik profil Şekil 9'da; uçucu yağ kompozisyonu ise Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Şekil 9.** *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* bitkisinin gaz kromatografik profili

Tablo 10. Çalışmada elde edilen *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* uçucu yağının kimyasal kompozisyonu

Bileşik	RT*	%
Thujene	2.83	1.47
Camphene	3.32	0.08
α -Pinen	3.92	0.20
3-Carene	4.64	0.11
α -Myrcene	4.96	4.16
α -Terpinene	5.27	2.98
Limonene	5.69	0.38
Sabinene	5.90	0.34
2-Hexenal	6.27	0.33
γ -Terpinene	6.91	16.69
p-Cymene	7.61	13.97
3-Hexen-1-ol	11.25	0.07
3-Octanol	11.57	0.30
p-Cymenene	13.02	0.58
1-Octen-3-ol	13.64	0.53
trans-Sabinene hydrate	14.00	0.10
Benzaldehyde	16.16	0.08
cis-Sabinene hydrate	17.05	0.05
Linalool	17.27	0.08
Caryophyllene	18.45	6.31
Aromadendrene	18.73	0.39
1-4-Terpineol	19.00	0.69
Junipene	19.73	0.08
α -Humulene	21.02	0.28
Ledene	22.02	0.31
Borneol	22.56	0.24
γ -Elemene	23.36	0.06
L-Carvone	23.57	0.35
Benzoik asit 2-(acetyloxy)-	23.98	0.06
δ -Cadinene	24.33	0.10
Benzoik asit 2-hydroxy-	25.16	0.25
Benzene	26.41	0.13
Benzenemethanol	28.05	0.03
p-Isopropylphenetole	30.06	0.06
Caryophyllene oxide	31.83	0.23
Spathulenol	36.69	0.18
Eugenol	38.30	0.04
2-Methyl-3-butyn-2-ol	39.09	1.04
4-ethyl-2,6-xilenol	39.61	0.10
Carvacrol	39.96	43.60
Trimethyl(phenyl)silane	41.29	0.04
p-(-2methylallyl)-	45.92	1.65
2-pentadecyl ester	49.05	0.16
Hexadecanoic acid	58.24	0.09
1,4-dimethoxy-2,6dimethylbenzene	62.07	0.22
Octadecanoic acid	63.09	0.16
12-Methoxy-3-methylcholanthrene	65.82	0.06

*RT: Retention time (Dakikada alıkonma zamanı)

GC-MS analizi sonucunda analiz edilmiş olan uçucu yağın 47 farklı kimyasal bileşik içerdiği belirlendi. Tanımlanmış olan bileşiklerin, toplam uçucu yağın %99.41'ini oluşturduğu ortaya kondu. Zahtere ait bu uçucu yağın %43.60'ı fenolik bir bileşik olan karvakrolden oluştuğu gözlemlendi. Uçucu yağın başlıca komponentlerinin sırasıyla γ -terpinen (% 16.69), p-simen (% 13.97), karyofilen (% 6.31), α -mirsen (% 4.16), α -terpinen (%2.98), p-(-2methylallyl)- (%1.65), Tujen (%1.47) ve dimetil etil karbinol (%1.04)'den oluştuğu belirlendi.

4.3. Uçucu Yağın *in vitro* Antimikrobiyel Etkinliği

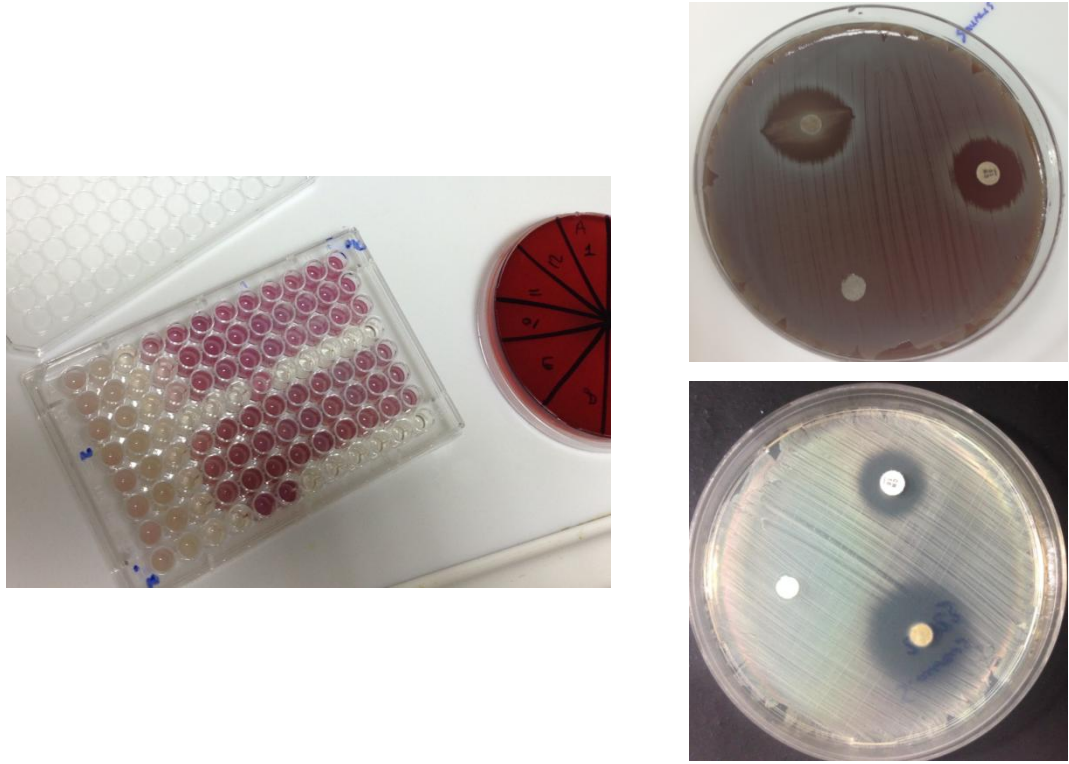
Thymbra spicata L. subsp. *spicata* bitkisi uçucu yağının antimikrobiyel etkinliğinin *in vitro* ortamda belirlenmesi için disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon testleri kullanıldı. Uçucu yağın *S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine göstermiş olduğu antimikrobiyel aktivite ile ilgili sonuçlar Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Zahter uçucu yağının antimikrobiyel etkinliği

Mikroorganizma	Disk Difüzyon ^a		MIC Değeri ^b
	Uçucu Yağ	Gentamisin (N, 10 µg)	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	21	19	3.16
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	18	20	5.53
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900	25	22	5.44
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19	20	4.54
<i>L. monocytogenes</i> N 7144	16	33	3.56

^a: Disk difüzyon sonucu ölçülen inhibisyon zonu (mm), 5 mm disk çapı dahildir.

^b: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu. Değerler, mg mL⁻¹ olarak verildi.



Şekil 10. *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* uçucu yağının *in vitro* antimikrobiyel etkinliği

4.4. Duyusal Analiz Sonuçları

Çalışma kapsamında oluşturulan 3 deney grubuna ait sucuk örneklerinin organoleptik muayene sonucunda ortaya çıkan duyusal analiz değerlendirilmesi Tablo 12’de gösterilmiştir.

Duyusal analiz sonuçlarına göre; deneysel gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Sucuklardaki genel beğeni düzeyinde her grup birbirinden farklı bulunmuş ve uçucu yağ içermeyen grubun genel beğeni düzeyinin en iyi olduğu, 500 ppm düzeyinde uçucu yağ ihtiva eden grubun ise en az beğenilen grup olduğu görülmüştür.

Tablo 12. Olgunlaşma sonrasında deneysel sucuk gruplarının duyu analizi sonuçları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	İstatistik önem kontrolü (Kruskal-Wallis testi)
	Medyan (%25; %75)	Medyan (%25; %75)	Medyan (%25; %75)	
Renk	4 (4; 4) ^a	4 (3; 4) ^a	3 (3; 4) ^b	P=0,004
Koku	4 (3; 4) ^a	3 (3; 4) ^b	2 (2; 3) ^c	P<0,001
Kıvam	4 (3; 5) ^a	4 (3; 4) ^a	3 (3; 4) ^b	P=0,006
Lezzet	4 (3; 5) ^a	3 (3; 4) ^b	2 (2; 3) ^c	P<0,001
Genel Beğeni	4 (3; 5) ^a	3 (3; 4) ^b	3 (2; 3) ^c	P<0,001

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (P* $<0,017$, *: Benferroni düzeltmesi uygulanmıştır.)

Cevap 1. Çok Kötü

Cevap 2. Kötü

Cevap 3. Orta

Cevap 4. İyi

Cevap 5. Çok İyi

4.5. Deneysel Sucuk Gruplarının Oluşturulması ve Sucukların Olgunlaşma ve Muhafaza Süresince Mikrobiyolojik Takibi

Çalışmada, fermente Türk sucuğuna 300 ve 500 ppm düzeyinde zahter uçucu yağı katılmasının mikrobiyolojik ve kimyasal parametrelerde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ortaya kondu.

4.5.1. Sucuk Hamurlarının Başlangıç yükleri

Deneysel olarak gruplar için hazırlanmış olan sucuk hamurlarının başlangıç mikrobiyolojik yükleri Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13. Sucuk hamurlarına ait başlangıç mikrobiyolojik analiz bulguları (log kob/g)

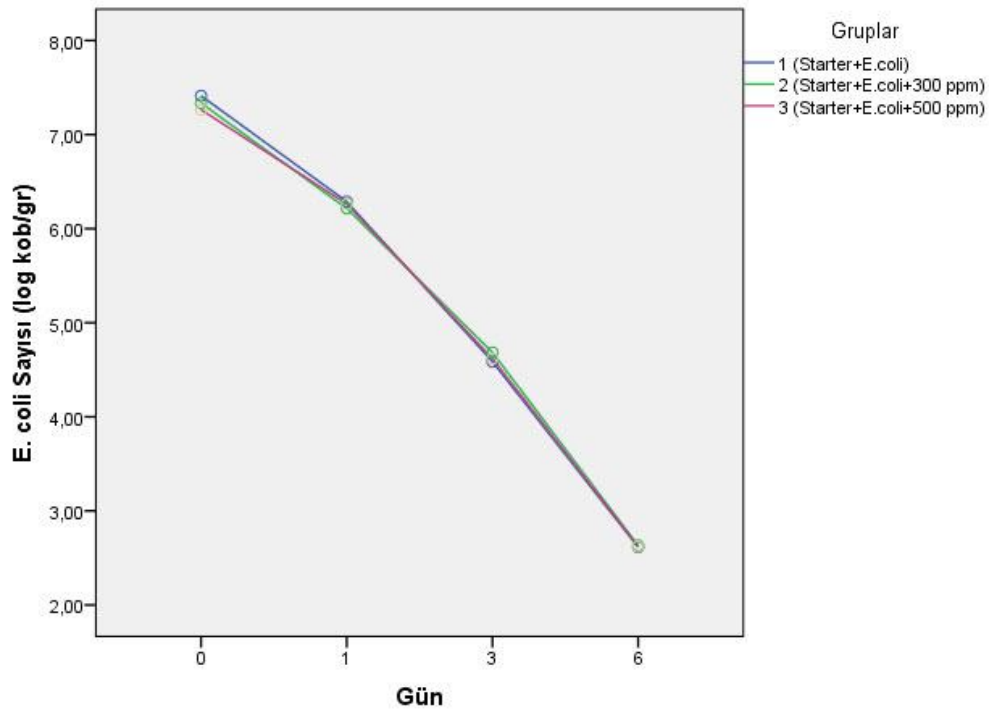
Sucuk Hamuru	AMGC $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	LAB $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Mik./Staf. $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Koliform Grubu $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
Kontrol	6,25 $\pm$ 0,164	5,03 $\pm$ 0,211	4,34 $\pm$ 0,171	3,22 $\pm$ 0,212
300 ppm	6,32 $\pm$ 0,118	5,29 $\pm$ 0,209	4,47 $\pm$ 0,209	3,21 $\pm$ 0,208
500 ppm	6,45 $\pm$ 0,142	5,14 $\pm$ 0,244	4,35 $\pm$ 0,220	3,16 $\pm$ 0,191

AMGC: Aerobik mezofil genel canlı sayısı; LAB: Laktik asit bakteri sayısı;

Mik./Staf.: Mikrokok/Stafilokok sayısı.

4.5.2. *E. coli* Sayısı

Tablo 7’de belirtilen şekilde oluşturulan *E. coli* ilave edilmiş ilk üç deney grubunda yer alan sucukların olgunlaşma ve muhafazası süresince *E. coli* sayılarındaki değişimler Tablo 14 ve Şekil 11’de verildi. Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki *E. coli* düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p=0,462$). Tüm gruplarda olgunlaşma süresince *E. coli* düzeylerinin zamanla azaldığı ve bu düşüşün istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için grup zaman interaksiyonuna bakılmış ve istatistiksel olarak bu interaksiyon da önemli bulunmamıştır ($p=0,505$). Buna göre olgunlaştırma sürelerinde *E. coli* düzeylerinin gruplara göre farklı olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada muhafaza döneminde *E. coli* sayısı saptama sınırlarının altına düştüğünden istatistiki önemlilik testi, olgunlaşma döneminde yapılan analizler üzerinden gerçekleştirilmiştir.



Şekil 11. Deneysel olarak üretilen sucuklarda *E. coli* düzeyleri

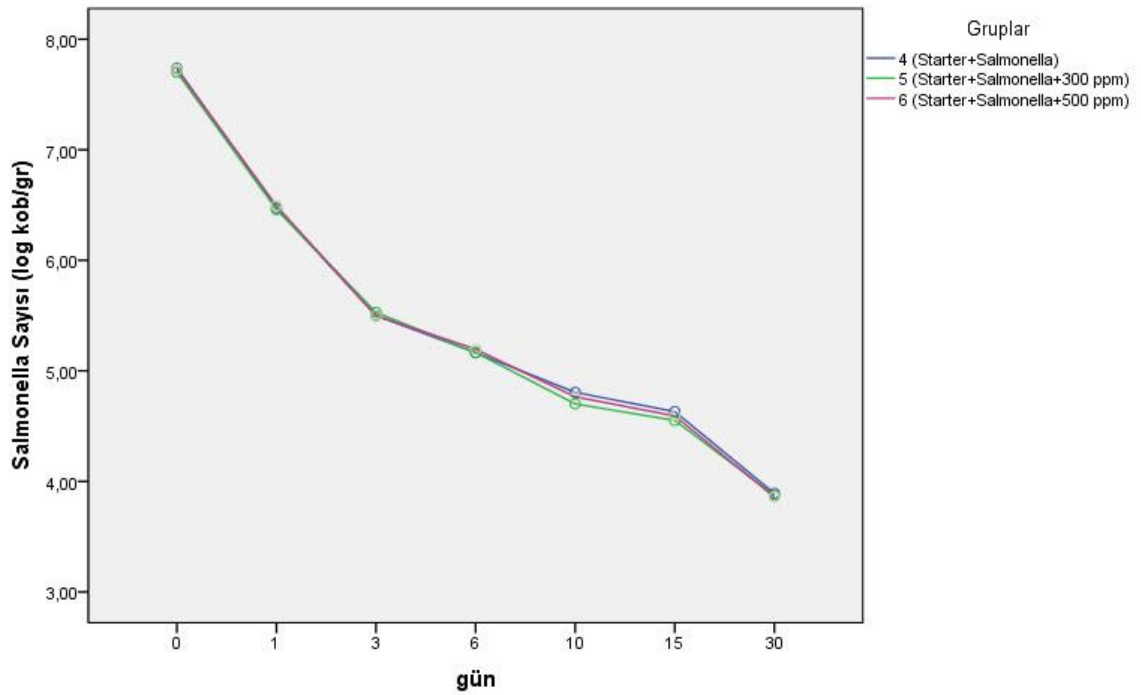
Tablo 14. Deneyisel sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresince *E. coli* düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)

Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaştırma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
1. Grup	7,41±0,103	6,29±0,039	4,59±0,009	2,61±0,064	<2,00	<2,00	<2,00	Gruplar: p=0.065; F=4.39 Zaman: p<0.001; F=3226.7 Grup-Zaman: p=0.283; F=1.37
2. Grup	7,33±0,048	6,21±0,026	4,68±0,032	2,63±0,012	<2,00	<2,00	<2,00	
3. Grup	7,26±0,071	6,26±0,070	4,62±0,018	2,62±0,038	<2,00	<2,00	<2,00	

* Çalışmada Muhafaza döneminde (+4 °C) *E. coli* sayımı yapılamadığından istatistiki önemlilik ilk 4 (0, 1, 3 ve 6. gün) analiz üzerinden yapıldı. Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

4.5.3. *Salmonella* Sayısı

Tablo 7’de belirtilen şekilde oluşturulan *Salmonella* ilave edilmiş son üç deney grubunda yer alan sucukların olgunlaşma ve muhafazası süresince *Salmonella* sayılarındaki değişimler Tablo 15 ve Şekil 12’de gösterilmektedir. Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki *Salmonella* düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p=0,131$). Olgunlaşma ve muhafaza sürelerinde *Salmonella* düzeylerinin gün ilerledikçe azaldığı ve bu düşüşün istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için grup zaman interaksiyonuna bakılmış ve istatistiksel olarak bu interaksiyon da önemli bulunmamıştır ($p=0,825$).



Şekil 12. Deneysel olarak üretilen sucuklarda *Salmonella* düzeyi

Tablo 15. Deneysel sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki *S. Typhimurium* düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)

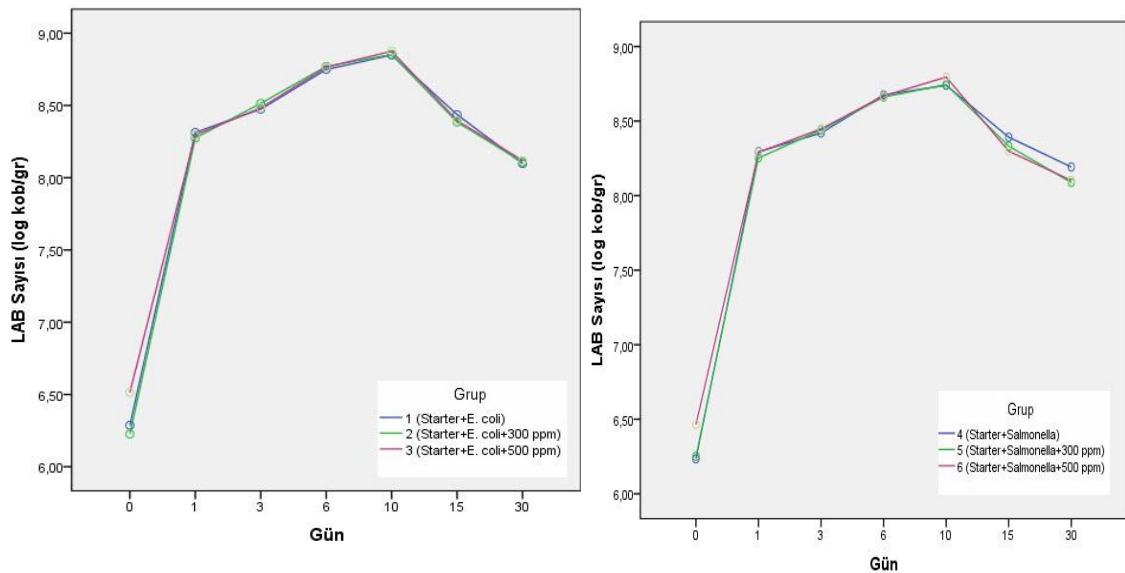
Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaşma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
4. Grup	7,74±0,042	6,47±0,032	5,50±0,076	5,16±0,015	4,81±0,042	4,63±0,031	3,89±0,013	Gruplar: p=0.131; F=2.91
5. Grup	7,70±0,051	6,46±0,030	5,53±0,030	5,17±0,007	4,70±0,048	4,55±0,049	3,83±0,033	Zaman: p<0.001; F=3047.8
6. Grup	7,73±0,022	6,49±0,012	5,50±0,076	5,20±0,039	4,76±0,024	4,59±0,021	3,86±0,023	Grup-Zaman: p=0.825; F=0.415

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

4.5.4. Laktik Asit Bakterileri (LAB) Sayısı

Sucuk gruplarının olgunlaşma ve muhafazası süreleri boyunca içerdikleri LAB sayılarındaki değişimler Tablo 16 ve Şekil 13’de verilmektedir. Sucuk hamurunun oluşturulduğu gün yapılan 0. gün analizlerinde 6.2-6.5 log kob/g seviyesinde olan LAB sayılarının olgunlaştırma sonrasında 8.6-8.7 log kob/g dolaylarına kadar yükseldiği ortaya kondu. Olgunlaşma sürelerinde LAB düzeylerinde görülen bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Olgunlaştırma sonrası +4 °C’de 30 güne kadar yapılan muhafaza süresinde ise LAB’ın 8.10-8.19 log kob/g seviyelerinde kaldığı belirlendi.

Thymbra spicata L. subsp. *spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağın LAB sayısı üzerine etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile uçucu yağ içeren gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı ($p=0.295$; $p=0.976$). Gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için grup zaman interaksiyonuna bakıldı ve istatistiksel olarak bu interaksiyon da önemli bulunmadı ($p=0.498$; $p=0.238$).



Şekil 13. DeneySEL olarak üretilen sucuklarda LAB düzeyleri

Tablo 16. Densiyel sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki LAB düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)

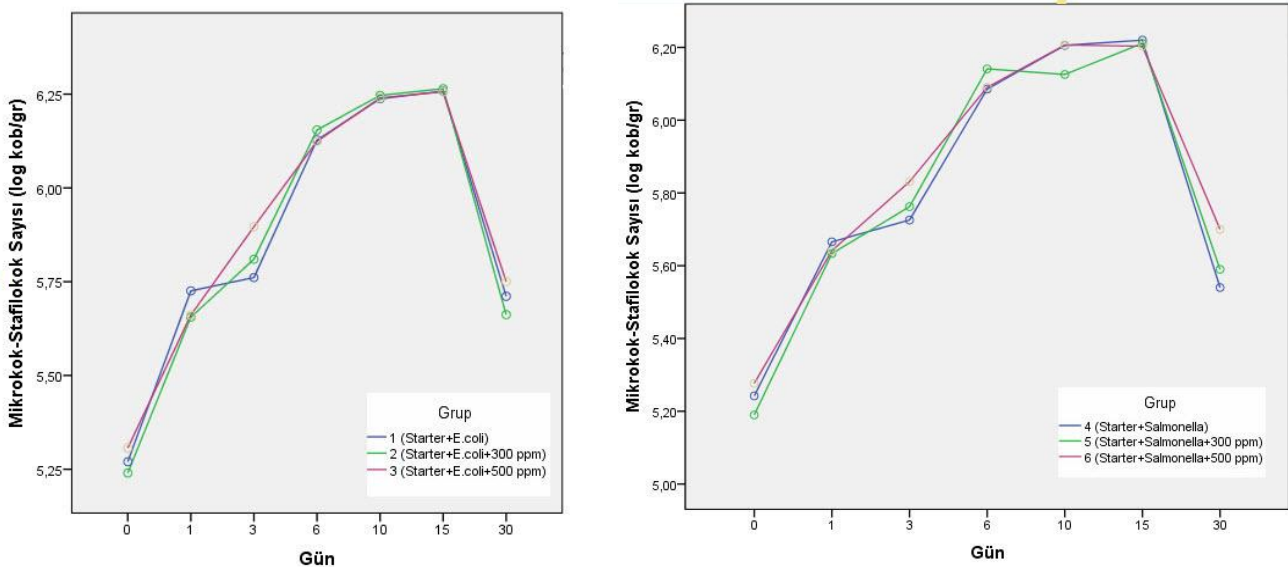
Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaşma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
1. Grup	6,29±0,094	8,31±0,013	8,47±0,004	8,75±0,040	8,85±0,040	8,44±0,024	8,10±0,001	Gruplar: p=0.295; F=1.507
2. Grup	6,23±0,243	8,27±0,023	8,51±0,011	8,77±0,037	8,85±0,022	8,38±0,044	8,11±0,019	Zaman: p<0.001; F=508.9
3. Grup	6,51±0,059	8,30±0,028	8,48±0,027	8,76±0,019	8,88±0,028	8,40±0,039	8,12±0,013	Grup-Zaman: p=0.498; F=0.831
4. Grup	6,23±0,230	8,29±0,129	8,42±0,149	8,68±0,140	8,74±0,113	8,39±0,128	8,19±0,057	Gruplar: p=0.976; F=0.024
5. Grup	6,25±0,255	8,25±0,118	8,44±0,163	8,66±0,110	8,74±0,105	8,33±0,149	8,09±0,139	Zaman: p<0.001; F=568.5
6. Grup	6,46±0,148	8,29±0,137	8,45±0,174	8,67±0,114	8,80±0,093	8,30±0,181	8,10±0,116	Grup-Zaman: p=0.238; F=0.482

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

4.5.5. Mikrokok-Stafilokok Sayısı

Sucuk gruplarının olgunlaştırma ve muhafazası süreleri boyunca içerdikleri Mikrokok-Stafilokok bakteri sayılarındaki değişimler Tablo 17 ve Şekil 14’de verilmektedir. Sucuk hamurunun oluşturulduğu gün yapılan 0. gün sayımında yaklaşık olarak 5.20-5.30 log kob/g olan Mikrokok-Stafilokok düzeyinin olgunlaşma sonrasında 6.10 log kob/g dolaylarına kadar yükseldiği ortaya kondu. Olgunlaşma sürelerinde Mikrokok-Stafilokok düzeylerinde görülen bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Olgunlaşma sonrası +4 °C’de 30 güne kadar yapılan muhafaza süresinde ise Mikrokok-Stafilokok sayılarının 5.50-5.70 log kob/g seviyelerinde olduğu belirlendi.

Thymbra spicata L. subsp. *spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağın Mikrokok-Stafilokok bakteri sayısı üzerine etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile uçucu yağ içeren gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı ($p=0.483$; $p=0.965$). Gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için grup zaman interaksiyonuna bakıldı ve istatistiksel olarak bu interaksiyon da önemli bulunmadı ($p=0.855$; $p=0.793$).



Şekil 14. DeneySEL olarak üretilen sucuklarda Mikrokok-Stafilokok bakteri düzeyleri

Tablo 17. Deneyisel sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki Mikrokok-Stafilokok düzeyleri ve istatistik önemlilik dereceleri (log kob/gr)

Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaşma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
1. Grup	5,27±0,113	5,73±0,018	5,76±0,045	6,13±0,040	6,24±0,023	6,26±0,046	5,71±0,092	Gruplar: p=0.483; F=0.824
2. Grup	5,24±0,104	5,66±0,009	5,81±0,057	6,15±0,029	6,25±0,020	6,26±0,033	5,66±0,046	Zaman: p<0.001; F=113.7
3. Grup	5,31±0,054	5,66±0,035	5,90±0,098	6,12±0,033	6,24±0,038	6,26±0,037	5,75±0,058	Grup-Zaman: p=0.855; F=0.855
4. Grup	5,24±0,211	5,67±0,146	5,73±0,125	6,09±0,128	6,21±0,123	6,22±0,178	5,54±0,049	Gruplar: p=0.965; F=0.035
5. Grup	5,19±0,053	5,63±0,157	5,76±0,108	6,14±0,095	6,13±0,162	6,21±0,139	5,59±0,150	Zaman: p<0.001; F=109.9
6. Grup	5,28±0,108	5,64±0,157	5,83±0,162	6,09±0,114	6,21±0,163	6,20±0,120	5,70±0,064	Grup-Zaman: p=0.793; F=0.524

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

4.6. Deneysel Olarak Üretilen Sucuklarda Olgunlaşma ve Muhafaza Esnasında Meydana Gelen Kimyasal Değişimler

4.6.1. pH

Çalışma kapsamında deneysel olarak üretilen fermente sucukların olgunlaşma ve muhafaza sürelerindeki pH değişimlerine ilişkin veriler Tablo 18’de gösterilmektedir. Farklı düzeylerde katılmış uçucu yağ içeren gruplar ile kontrol grupları arasında pH düşüşü ile ilgili bir fark oluşmadığı ortaya kondu ($p=0.065$; $p=0.223$).

4.6.2. Kuru Madde (KM)

Çalışma kapsamında deneysel olarak üretilen fermente sucukların olgunlaşma ve muhafaza sürelerindeki KM değişimlerine ilişkin veriler Tablo 19’da gösterilmektedir. Yapılan analizler neticesinde muhafaza ve olgunlaşma sürelerinde kuru madde oranlarının gruplara göre farklı olmadığı belirlendi ($p=0.96$; $p=0.518$).

Tablo 18. Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki pH değerleri ve istatistik önemlilik dereceleri

Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaşma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
1. Grup	6,17±0,027	5,13±0,007	4,93±0,009	4,86±0,006	4,88±0,009	4,81±0,006	4,98±0,023	Gruplar: p=0.065; F=4.39 Zaman: p<0.001; F=3226.7 Grup-Zaman: p=0.283; F=1.37 Gruplar: p=0.950; F=0.051 Zaman: p<0.001; F=2624.1 Grup-Zaman: p=0.223; F=0,506
2. Grup	6,09±0,015	5,12±0,009	4,84±0,027	4,82±0,007	4,86±0,006	4,79±0,006	4,89±0,006	
3. Grup	6,11±0,021	5,11±0,013	4,82±0,006	4,80±0,012	4,87±0,010	4,84±0,013	4,90±0,006	
4. Grup	6,10±0,012	5,13±0,013	5,02±0,031	4,93±0,023	4,84±0,026	4,79±0,007	4,76±0,006	
5. Grup	6,18±0,015	5,14±0,015	5,08±0,007	4,91±0,021	4,82±0,021	4,82±0,012	4,89±0,031	
6. Grup	6,08±0,018	5,16±0,007	5,01±0,009	4,89±0,023	4,81±0,023	4,80±0,007	4,83±0,019	

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

Tablo 19. Sucuk örneklerinin olgunlaşma ve muhafaza süresindeki KM değerleri (%) ve istatistik önemlilik dereceleri

Gruplar	Analiz Günleri							Tekrarlı Analizlerde İstatistik Önemlilik
	Olgunlaşma				Muhafaza (+4°C)			
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	6. Gün	10. Gün	15. Gün	30. Gün	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
1. Grup	45,13±1,866	45,37±1,810	49,43±2,035	55,15±1,726	58,85±2,011	63,90±1,986	70,52±1,442	Gruplar: p=0.96; F=0.036 Zaman: p<0.001; F=2790.1 Grup-Zaman: p=0.091; F=2.13
2. Grup	45,29±1,458	45,37±1,467	50,07±1,620	56,27±1,053	59,53±1,705	64,59±1,728	71,20±1,052	
3. Grup	44,89±2,029	45,20±1,757	50,03±2,088	56,04±2,060	57,70±1,769	63,21±1,593	71,30±1,647	
4. Grup	46,59±0,335	46,70±0,336	52,02±0,153	61,02±0,096	64,08±0,126	69,10±0,175	74,38±0,466	Gruplar: p=0.518; F=0.735 Zaman: p<0.001; F=13563.4 Grup-Zaman: p=0.40;F=1.103
5. Grup	46,16±0,712	46,30±0,711	51,41±0,721	60,51±0,738	63,49±0,651	68,41±0,730	73,48±0,318	
6. Grup	46,60±0,396	46,71±0,416	52,06±0,290	61,08±0,253	64,11±0,222	69,13±0,253	74,89±0,442	

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

4.6.3. Olgunlaşma Sonrası Sucuk Gruplarının TBA Değerleri

Çalışmada farklı miktarlarda uçucu yağ içeren deney gruplarındaki (Kontrol, 300 ppm, 500 ppm) fermente sucukların olgunlaşma sonrası TBA değerleri (mg malonaldehit/kg) Tablo 20’de verilmektedir. Çalışmada oluşturulmuş olan sucuk grupları arasında TBA değeri bakımından istatistiki olarak bir fark gözlenmedi. TBA değeri bakımından *E. coli* ve *S. Typhimurium* içeren sucuk grupları arasında da bir fark oluşmadığı ortaya konuldu ($p=0.808$; $p=0.225$).

Tablo20. Olgunlaşma sonrası sucuk gruplarına ait TBA (mg malonaldehit/kg) değerleri.

Deney Grupları	TBA değerleri (mg malonaldehit/kg)			İstatistiki Önemlilik
	Min	Maks	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Grup 1	0.88	1.12	0,99±0,067	p=0.808
Grup 2	0.99	1.16	1,05±0,055	
Grup 3	0.94	1.15	1,02±0,064	
Grup 4	0.89	0.90	0,89±0,004	p=0.225
Grup 5	0.90	1.0	0,94±0,030	
Grup 6	0.89	0.95	0,91±0,018	

Tabloda gösterilen bulgular yapılan 3 tekrarın ortalamasıdır.

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Lamiaceae (veya Labiatae) ailesine ait kekik ve türevleri, et ve et ürünleri başta olmak üzere birçok gıdaya uzun zamandan beri aroma verici olarak katılmaktadır. Lezzet artışının yanı sıra antimikrobiyel etkinlikleri ile gıdaların muhafaza sürelerini de arttırabilmektedirler. Doğal gıda maddeleri olmaları dolayısıyla bu bitkiler ve bunlardan elde edilen uçucu yağlar, sentetik gıda katkı maddelerinin güvenilirliğini sorgulayan bilinçli tüketiciler tarafından daha çok ilgi görmektedir. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan bazı sentetik kimyasalların, ağız yoluyla alınan bazı maddeleri toksik maddelere veya karsinojenlere dönüştürebileceği öne sürülmektedir (393). Benzer şekilde bazı kimyasal maddelerin koroziv etkilerinden dolayı göz ve üst solunum yollarında iritasyona neden olabileceği belirtilmektedir. Buna karşın antimikrobiyel etkinlikleri bilinen bazı bitkilerin ve bitki ekstraktlarının kullanıcıda ve tüketicide herhangi bir sağlık problemi oluşturmadığı bildirilmektedir (20, 382, 393, 394). Bu manada günümüzde bilinçli tüketici talepleri doğrultusunda kimyasal katkı maddelerine alternatif olarak gıdalarda antimikrobiyel etkinlikli bitkisel ürünlerin kullanılması artan bir ilgi görmektedir.

Ülkemizde “zahter”, “kara kekik”, “karabaş kekik” gibi isimler ile bilinen *Thymbra spicata* L., Türkiye, Yunanistan, Mısır gibi doğu Akdeniz bölgesi ülkelerinde de antik zamanlardan beri bilinen ve çeşitli amaçlarla kullanılan değerli bir bitkidir. Tat ve aroma amacıyla gıdalarda kullanımının yanı sıra medikal amaçla da geniş kullanım alanı bulmuştur. Örneğin antimikrobiyel etkinliği nedeniyle bronşit tedavisi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (395, 396). Doğal ürünlerin tıbbi amaçla kullanımı son yıllarda artış göstermekte, bu artışın nedenleri arasında ise sentetik ilaçların yan etkilerinin fazlalığı ve bu ilaçlara karşı mikroorganizmalarda gelişen direnç yer almaktadır. Dünyanın çeşitli bölgelerinden toplanan bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyel özelliklerini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (367, 372, 382, 393, 394).

Bu çalışmada *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* olarak doğrulanan bitki kurutulduktan sonra hidrodistilasyon yöntemi ile ekstrakte edildi. $62,59 \pm 7,633$ g bitkiden ortalama $1,51 \pm 0,282$ mL uçucu yağ elde edilerek, verimlilik %2.41 olarak belirlendi. Benzer şekilde aynı yöntemle *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* bitkisinden uçucu yağ elde edilen bir çalışmada (22) verimlilik oranı % 3.1 olarak rapor edilmektedir. Akgül ve ark. (395) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise zahter bitkisinden % 4.3 oranında uçucu yağ elde edildiği bildirilmiştir. Söz konusu çalışmalarla karşılaştırıldığında bu çalışmada elde edilen ekstraksiyon verimliliğinin düşük olduğu görülmektedir.

Çalışma kapsamında elde edilen *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* uçucu yağının kimyasal kompozisyonun belirlenmesi amacıyla yapılan GC-MS analizi sonucunda, analiz edilen uçucu yağın 47 farklı bileşik içerdiği belirlendi. Analizde tanımlanmış olan bileşiklerin toplam uçucu yağın %99.41'ini oluşturduğu ortaya kondu. Yapılan bir çalışmada kromatografi sonucunda uçucu yağın %97.8'inin kimyasal olarak tanımlandığı (22); bir başka çalışmada ise %99'unun tanımlandığı belirtilmektedir (397). Ünlü ve ark. (398) tarafından yürütülen bir çalışmada ise zahter uçucu yağının GC-MS ile kimyasal kompozisyonun %97.04'ü ortaya konmuştur. Bu çalışmanın kromatografi verimliliği bahsi geçen çalışmalardan yüksektir.

Zahterden elde edilmiş olan uçucu yağın %43.60'ının fenolik bir bileşik olan karvakrolden oluştuğu ve takiben sırasıyla γ -terpinen (% 16.69), p-simen (% 13.97), karyofilen (% 6.31), α -mirsene (% 4.16), α -terpinen (%2.98), p-(-2methylallyl)- (%1.65), tujen (%1.47) ve dimetil etil karbinol (%1.04) içerdiği ortaya kondu. Kılıç, (22) tarafından yapılan çalışmada kullanılan zahterin, uçucu yağ ana bileşenlerinin karvakrol (%34.9), γ -terpinen (%25.6), p-simen (%9.1), α -terpinen (%6.9), tujen (%5.2), trans-karyofilen (%5.1) ve β -mirsene (%4.8) olduğu rapor edilmiştir. Zahter kullanılan bir başka çalışmada (21) ise uçucu yağ içeriği %75.5 karvakrol, %11.6 γ -terpinen ve %9.2 oranında p-simen olarak rapor edilmiştir. Ünlü ve ark., (398) tarafından zahter kullanılarak yapılan bir çalışmada uçucu yağ temel bileşiklerinin yaklaşık %60.39 karvakrol, %12.95 γ -terpinen, %9.61 p-simen, %2.35 β -Myrcene ve %2.22 trans-karyofilenden oluştuğu bildirilmiştir. Markovic ve ark. (397) tarafından yapılan çalışmada *Thymbra spicata* uçucu yağının %74.5'i karvakrol, %8.12'si γ -terpinen ve %5.62'si p-simen olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen uçucu yağ kompozisyonundaki temel bileşenler, belirtilen çalışmadakiler ile benzerlik

göstermekte, bu çalışmaların tümünde olduğu gibi; bu araştırmada da karvakrol en yüksek oranlı fenolik bileşik olarak belirlenmiştir. Öte yandan ilgili çalışmalarda, bileşen oranları arasında önemli farklılıklar dikkat çekmektedir. Söz konusu farklar, ekstraksiyon verimliliğine, bitkinin toplandığı mevsime, coğrafi bölgeye, distilasyon tekniğine ve saklama koşullarına göre değişkenlik göstermesinden kaynaklanmış olabilir (381, 382). Çünkü aynı bitkiye ait uçucu yağların ekstraksiyon verimliliği ve kimyasal kompozisyonlarının farklı zamanlarda değişiklik göstermesi doğal bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmada *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyel etkinliği araştırılmıştır. Mikroorganizmaların bitkilerden elde edilen etken maddelere karşı duyarlılıklarının tespitinde broth dilüsyon, disk difüzyon ve agar difüzyon testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (399). Dolayısıyla bu çalışmada zahter uçucu yağının *in vitro* antimikrobiyel etkinliğinin belirlenmesi için disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon metodları kullanılmıştır.

Bu çalışmada, uçucu yağ emdirilmiş 5 mm disklerin, *in vitro* ortamda *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiş agarlarda sırasıyla 21, 18, 25, 19 ve 16 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu ortaya kondu. Bu çalışmada kullanılan zahterin oluşturduğu antimikrobiyel etkinliğin Sağdıç ve Özcan (2003) tarafından belirlenenden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (400). Nitekim Sağdıç ve Özcan (2003) tarafından yapılan çalışmada, zahter uçucu yağının antimikrobiyel aktivitesi aynı metotla incelenmiş, *E. coli*'nin 13 mm, *S. aureus*'un 10 mm'lik bir zon oluşturduğu; *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'de ise zon oluşmadığı belirtilmiştir (400). Öte yandan Ünlü ve ark. (2009), *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* için sırasıyla, 26, 24, 24 ve 26 mm çapında inhibisyon zonu ölçerek, kullandıkları zahter uçucu yağının bu çalışmadan daha yüksek antimikrobiyel etkinlik sergilediğini ortaya koymuşlardır (398). Akın ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada da *S. aureus* ve *S. Typhimurium* üzerine antimikrobiyel etkinlik rapor edilmiş ancak farklı olarak *E. coli* üzerinde herhangi bir antimikrobiyel etkinin olmadığı bildirilmiştir (377).

Broth dilüsyon ve disk difüzyon methodlarının amacı, belli koşullar altında, bir antimikrobiyel ajanın, hedef bakterilerin üremesi üzerine tespit edilebilir bir inhibisyon

şekillendirecek minimal konsantrasyonlarının (MIC; Minimal Inhibitory Concentration) belirlenmesidir. MIC değerleri bakterilerin belli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesinin yanı sıra yeni antimikrobiyel ajanların aktivitelerini değerlendirmek amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır. Agar difüzyon metodu antimikrobiyel maddenin farklı konsantrasyonlarının nutrient agara uygulanmasının ardından belli sayıda bakteri hücresinin agar yüzeyine ekilmesi şeklinde yapılmaktadır. Broth mikrodilüsyon ise sıklıkla 96 kuyucuklu mikrotitre plaka formatında uygulanmakta, bakteriler antimikrobiyel ajanın farklı konsantrasyonlarını içeren sıvı besi yerine inokule edilerek uygulanmaktadır. Bakteriyel üreme belli bir inkubasyon sonucunda değerlendirilerek MIC değeri okunur. Bu protokol sadece aerob bakterilere uygulanabilmektedir (401).

Farklı çalışmalardan elde edilen verilerin sağlıklı bir şekilde karşılaştırılabilmesi için sadece aynı metodolojiyi kullanmış olmaları yeterli değildir. Çeşitli antimikrobiyellere ilişkin, hızlı, güvenilir ve kolay bir sonuç eldesi ve farklı çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi açısından MIC değerinin belirlenmesi kritik önem taşımaktadır (402). Dolayısıyla bu çalışmada disk difüzyonla inhibisyon zonu ölçümü yanı sıra zahter ekstratının seçilen patojenler için MIC değerleri de belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan broth mikrodilüsyon testiyle bitki uçucu yağının *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerindeki MIC değerleri sırasıyla 3.16, 5.53, 5.44, 4.54 ve 3.56 mg mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Ünlü ve ark. (398) tarafından yapılan çalışmada aynı bitki uçucu yağının *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* üzerindeki MIC değerleri sırasıyla 1.12, 4.50, 2.25 ve 1.12 mg mL⁻¹ olarak ortaya konmuştur. Bu araştırmada ortaya konan MIC değerlerinin Ünlü ve ark. (398)'a oranla yüksek olduğu dolayısıyla zon çapı ölçümlerinde de olduğu gibi araştırmacıların kullandıkları zahter uçucu yağının bu çalışmada kullanılandan daha etkili olduğu görülmektedir. Markovic ve ark. (397) tarafından yapılan çalışmada *Thymbra spicata* uçucu yağının *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyel etkinlikleri incelenmiş ve test edilen her bir ajan için belirlenen MIC değerlerinin sırasıyla 0.30, 0.30, 0.60 ve 1.25, µg/mL olduğu rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen veriler bu araştırmada belirlenen MIC değerleri ile uyum göstermemektedir. Farklı çalışmalarda belirlenen MIC değerleri arasındaki farkların uçucu yağın kimyasal kompozisyonuna etki eden mevsimsel ve coğrafi farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (400). Bitki

etken maddelerinin aktivitesi; bitkinin toplanma zamanı ve bölgesi, kurutma ve depolanma koşulları ve bitkiye uygulanan işlemlere göre de değişkenlik gösterebilmektedir. Her bitkinin uçucu yağını oluşturan etkili bileşenlerin en yüksek düzeyde bulunduğu bir dönem bulunmaktadır. Bu dönemde toplanan bitki, tıbbi yönden etkili iken başka bir dönemde toplanmış olması tıbbi etkinliğini düşürebilmektedir (19). Lamiaceae ailesi bitkilerinin, çiçeklenme dönemi olan Mayıs-Eylül aylarında toplandıklarında daha etkili ve zengin bir uçucu yağ profili sergileyebilecekleri belirtilmiştir (403). Bu çalışmada Lamiaceae ailesine mensup olan *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* bitkisi Mayıs-Temmuz döneminde toplandığı için, uçucu yağ bileşen aktivitesi yönünden oldukça etkin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca uygun kurutma işlemi uygulandığında ve muhafazanın uygun rutubet, sıcaklık ve ışık koşulları altında yapıldığı durumlarda, bitkilerin bir yıl boyunca etkinliklerini koruyabileceği, bir yıldan sonra bitkisel materyale ait etkili bileşenlerin inaktive olarak antimikrobiyel etkinliğinin azalabileceği belirtilmektedir (19). Bu çalışmada serin, kuru ve karanlık koşullarda saklanmış olan bitki kurusu bir ay içinde analize alınmıştır.

Çalışmada deneysel olarak üretilen sucuk hamurları; starter kültür ilavesi ve bakteriyel inokulasyondan önce aerobik mezofil genel canlı (AMGC), LAB ve mikrokok/stafilokok sayıları açısından analiz edildi. Bu aşamada kontrol grubunda AMGC, LAB, mikrokok/stafilokok ve koliform sayıları sırasıyla, 6.25 ± 0.164 , 5.03 ± 0.211 , 4.34 ± 0.171 , 3.22 ± 0.212 log kob/g düzeylerinde tespit edildi. Gücükoğlu, (39) tarafından yapılan bir çalışmada hammaddeye ait AMGC 5.3-5.5 log kob/g, LAB 5.0-5.1 log kob/g ve mikrokok/stafilokok sayısı 4.4-4.7 log kob/g düzeylerinde bulunmuştur. AMGC bakımından bu araştırmada ortaya konan değerlerden yüksek, LAB ve mikrokok/stafilokok sayısı bakımından değerlerin benzer olduğu gözlenmektedir.

Starter kültür ile üretilen deneysel sucuğun 0. gün analizinde, LAB ve mikrokok/stafilokok sayısının arttığı dikkat çekmektedir. Fermentasyon; gıdaların muhafazası, mikrobiyel güvenlik, standart ve iyi kaliteli üretim sağlanması gibi avantajları nedeniyle önemli bir gıda işleme yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Özellikle et ürünleri fermentasyonunda LAB önemli rol oynamaktadır. Etin doğal biotasında bulunan LAB'ın et ürünlerinde olgunlaşmanın ilk gününden itibaren baskın

hale geldiği ve ürüne özgü karakteristik özelliklerin oluşmasına önemli katkı sağladığı bilinmektedir (404, 405).

Çalışmada deneysel olarak üretilen sucukların LAB başlangıç yüklerinin 5.03-5.14 log kob/g düzeylerinde olduğu, starter kültür ilavesi ile 6,23 - 6.51 log kob/g düzeylerine yükseldiği, olgunlaşma boyunca 8,66-8.77 düzeylerine ulaştığı ve 30. günde 8,09-8,19 log kob/g düzeylerine düştüğü belirlenmiştir. Zahter uçucu yağının sucuk formülasyonuna 300 ve 500 ppm düzeylerinde ilave edilmesi, LAB'ın üreme eğrisi üzerinde istatistiki açıdan önemli bir fark oluşturmamıştır ($p=0.295$; $p=0.976$). LAB'ın üreme eğrisi detaylı olarak Tablo 16'da gösterilmiştir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada olgunlaşmanın başında 7 log kob/g olan LAB düzeylerinin olgunlaşmanın 7. gününde 8-9 log kob/g düzeylerine yükseldiği ve deneysel olarak inoküle edilen suşun baskın hale geldiği bildirilmiştir (406). LAB sayısının bizim çalışmamıza benzer şekilde yükseldiği bir başka çalışmada araştırmacılar, 4 günlük olgunlaşma öncesinde 6,57 log kob/g olarak belirledikleri LAB sayısının olgunlaştırma sonrasında 7,95 log kob/g düzeyine çıktığını, +4 C'de muhafazanın 30. gününde ise değerin 7,56 log kob/g seviyelerine gerilediğini bildirmişlerdir (407). Bizim çalışmamızda da buzdolabı sıcaklığında muhafazada 30. günde benzer bir düşüş dikkat çekmektedir. LAB'ın sayısal olarak düşmesinde muhafaza sırasındaki mikroorganizmaların gelişim şartlarının değişmesi ve nem oranlarının düşmesi önemli rol oynamış olabilir (407). Pidcock ve ark. (408) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada starter kültür olarak *Lactobacillus acidophilus* kullanılmış ve olgunlaşmanın 0. günde 6,9 log kob/g olan LAB sayısının 3. olgunlaşma gününde 7,4 log kob/g düzeylerine yükseldiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada da LAB'ın benzer oranda artış gösterdiği belirlenmiştir.

Fermente et ürünlerinin kendilerine has özelliklerin şekillenmesinde LAB kadar mikrokok/stafilokokların da önemli bir etkinliği söz konusudur. Bu gruba mensup bakteriler lipolitik ve proteolitik aktiviteleri ile olgunlaşma esnasında çeşitli uçucu bileşiklerin son ürün olarak ortaya çıkmasını sağlayarak özellikle bazı et ürünlerine spesifik lezzet ve aroma kazandırmaktadır (409).

Bu çalışmada fermente sucuk yapımında 1:1 oranında *Staphylococcus carnosus* ve *Lactobacillus sakei*'den oluşan starter kültür katılmasından dolayı sucuk hamurunun mikrokok/stafilokok sayısında yükselme eğilimi gözlenmiştir. 4.34-4.47 log kob/g

düzeylerinde başlangıç yüküne sahip olan sucuklarda starter kültür ilavesi sonrası 0. gün mikrokok/stafilokok sayısının 5.19- 5.31 log kob/g düzeylerinde olduğu saptanmış, olgunlaşmanın son günü (6. gün) bu sayı 6.09-6.15 log kob/g düzeylerine yükselmiş, +4 °C’de muhafaza ile birlikte sayısal değer hemen hemen sabit seviyelerde seyretmiş ve 15. günden sonra düşüşe geçmiştir. Mikrokok/stafilokok seyri detaylı olarak Tablo 17’de gösterilmiştir. Bu bulgulara paralel olarak Johansson ve ark. (410) tarafından yapılan çalışmada *Staphylococcus xylosus* ile *Pediococcus pentosaceus* starter kültür olarak kullanılmış ve olgunlaşmanın 7. gününden itibaren üründe mikrokok/stafilokok sayısının düştüğü bildirilmiştir.

Bu çalışmada 30. günde mikrokok/stafilokok sayısının 5.54-5.75 düzeylerinde olduğu, sucuk formülasyonuna 300-500 ppm düzeylerinde zahter uçucu yağ ilavesinin mikrokok/stafilokok sayısı üzerinde istatistiki açıdan önemli bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir ($p=0.483$; $p=0.965$). Soyer ve ark. (411) tarafından yapılan bir çalışmada olgunlaşmanın başında 5,0 log kob/g olan mikrokok/stafilokok sayısının olgunlaşma esnasında ilk iki günde 7.3 log kob/g düzeylerine kadar yükseldiği ve olgunlaşmanın son günü olan 9. günde 6.7 log kob/g seviyelerinde düştüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada fermente sucuklara deneysel olarak katılan uçucu yağın starter kültürler üzerinde fermentasyonu olumsuz etkileyecek bir inhibisyon oluşturmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada deneysel olarak *E. coli* inokule edilen ve 300 veya 500 ppm düzeylerinde uçucu yağ içeren iki farklı sucuk formülasyonu, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde, farklı düzeylerde katılan uçucu yağların sucuk matriksinde *E. coli* üremesi üzerine kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmadığı belirlenmiştir ($p=0.065$). Olgunlaşmanın başında 7.26-7.41 log kob/g düzeylerinde olan *E. coli* yükünün olgunlaşma ile birlikte hızla azaldığı ve 10. gün analizinde tespit edilemeyecek seviyelere kadar gerilediği gözlemlenmiştir. Her üç grupta da olgunlaşma ve muhafaza esnasında *E. coli* düzeylerinde gözlenen düşüş, kullanılan starter kültürlerle rekabet, pH’nın düşmesi ve rutubet kaybıyla alakalı olabilir. Nitekim Ulusoy (5) tarafından yapılan bir çalışmada kefir kültürü ve starter kültür kullanılarak üretilen deneysel sucuklarda tüm gruplarda *E. coli* sayısının olgunlaşmanın birinci gününden itibaren azalmaya başladığı bildirilmiştir. Bu durum bizim çalışmamızdaki *E. coli* üreme eğrisi ile paralellik göstermektedir. Yine starter kültür katılarak deneysel sucuk yapılan bir başka çalışmada (412), sucuklarda fermentasyon ve muhafaza süresi

boyunca Enterobacteriaceae sayısının 4,86 log kob/g başlangıç yükünden, olgunlaşma sonrasında 1,27 log kob/g düştüğü ve soğuk zincirde muhafazada 3. gününden itibaren tespit edilemediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada da sucuklar olgunlaşma sonrasında +4 °C’de muhafaza edilmiş ve muhafaza boyunca *E. coli* düzeyleri tespit edilemeyecek düzeylere düşmüştür (Tablo 14).

Deneysel olarak *Salmonella* inokule edilen ve 300 ve 500 ppm düzeylerinde uçucu yağ katılan iki farklı sucuk deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. *Salmonella* üreme eğrisi açısından, her iki deney grubunda da kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenememiştir ($p=0.131$). Çalışmada 7.73-7.84 log kob/g düzeylerindeki başlangıç *Salmonella* spp. yükünün, olgunlaşma ile birlikte azaldığı ve 30. gün sonunda 3.86-3.89 log kob/g’a kadar düştüğü gözlenmiştir. Ulusoy (2007) tarafından yapılan çalışmada sadece *E. coli*’nin değil aynı zamanda Enterobacteriaceae sayısının da düşüş gösterdiği bildirilmektedir (5). Bu açıdan çalışmadaki *Salmonella* redüksiyonunun starter kullanımı, pH ve rutubet değişimine bağlı olduğu söylenebilir. *Salmonella* ve *E. coli* gibi patojen mikroorganizmaların deneysel olarak üretilmiş fermente sucuklarda istatistiki anlamda önemli düşüş göstermeleri doğru fermentasyon uygulamalarına ve muhafaza şartlarına tabi tutulmuş sucukların mikrobiyel anlamda daha güvenli olabileceğini ortaya koymaktadır.

Uçucu yağların *in vitro* antimikrobiyel etkinliğinin, gıda matriksinde de gözlenebilmesi için gıdalara çok daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanmaları gerektiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (413, 414). Örneğin *in vitro* gözlenen etkinliğin gıda da sergilenebilmesi için; yarım yağlı sültere 2 kat (344), sucuklara 10 kat, (383), yumuşak peynirlere ise 25 ile 100 kat arası (415) miktarların uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Uçucu yağların, gıda matriksinde beklenen antimikrobiyel etkinliği gösteremiyor olması, bazı sebepler ile açıklanmaktadır. İlk olarak bazı gıda komponentlerinin, uçucu yağın bakteri hücre zarına vermiş olduğu hasarın hızla onarılmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir (416). Özellikle yüksek protein ihtiva eden sucuk gibi gıdalarda uçucu yağların antimikrobiyel etkinliğine maruz kalan bakterilerin kendilerini çok daha etkili bir şekilde onarabildikleri kabul edilmektedir (417). Yapılan bir başka çalışmada da (418) zahter uçucu yağının ana bileşeni olan karvakrolün, gıda matriksinde proteinler ile reaksiyona girmesi, antimikrobiyel etkinliği

sınırlayıcı bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Buna paralel olarak peynir matriksinde karanfil yağının, *Salmonella* Enteritidis üzerine antimikrobiyel etkinliğinin incelendiği bir çalışmada (419), gıda ortamındaki protein varlığının antimikrobiyel etkinliği sınırladığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada kullanılan uçucu yağın, %43.60 oranında karvakolden oluştuğu ortaya çıkmıştır. Mikrobiyel inhibisyonda deney grupları ile kontrol grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir fark oluşmaması, karvakol başta olmak üzere ortamda bulunan uçucu yağ bileşenlerinin, sucuk matriksinde proteinler ile reaksiyona girerek antimikrobiyel etkinliklerinin azalması şeklinde yorumlanabilir.

Genel olarak yüksek oranda yağ ve/veya protein içeren gıdaların, mikroorganizmaları esansiyel yağların etkinliklerinden koruduğu varsayılmaktadır (383, 417, 420). Esansiyel yağlar, gıdanın sulu fazına oranla yağ fazında eriyerek birikme eğilimde olduğundan sulu fazda bulunan hedef mikroorganizmaları yeterince etkileyememektedir (421). Diğer bir bakış açısıyla, su aktivitesi düştükçe uçucu yağların bakterilerdeki hedef alanlara ulaşmasının zorlaştığı belirtilmektedir (419). Bu çalışmada materyal olarak kullanılan sucuğun protein ve yağ oranının yüksek olması ve olgunlaşma ve muhafaza esnasında sucuk kuru madde oranlarında görülen artış, gıda ortamında antibakteriyel etkinliği sınırlandıran önemli faktörler olarak değerlendirilmektedir.

Yine çeşitli esansiyel yağların farklı gıda matrikslerinde denendiği bazı çalışmalarda yağlı gıdaların esansiyel yağ antimikrobiyel etkinliğini sınırladığı yönünde sonuçlar bildirilmektedir. Örneğin nane yağının *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* üzerine antimikrobiyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (420), oldukça yağlı olduğu bilinen pate ve balık yumurtası salatalarındaki esansiyel yağ etkinliğinin, daha az yağlı olan cacıklardan elde edilenden düşük olduğu ortaya konmuştur. Pateden (pH 6.8) daha düşük pH'ya (4,3) sahip olan cacıkta uçucu yağ etkisinin pH'ya bağlı olarak da artmış olabileceği düşünülebilmektedir. Öte yandan balık yumurtası salatasının da 4.9 gibi daha düşük bir pH'ya sahip olduğu hesaba katıldığında, gıdalardaki yağ oranının esansiyel yağ etkinliğini pH'ya oranla daha çok etkilediği ortaya çıkmaktadır (420). Dolayısıyla bu çalışmada yağlı bir gıda olan sucuk ortamında uçucu yağ antimikrobiyel etkinliğinin, *in vitro* analiz sonuçları ile benzerlik göstermemesi doğal bir sonuç olarak yorumlanabilir. Ayrıca gıdalarda protein ve yağ içeriğinin yanı sıra gıdaya ait pH, diğer katkı maddeleri gibi çeşitli intrinsik faktörler, ortam sıcaklığı, atmosfer ve paketleme

gibi ekstrinsik faktörlerin de uçucu yağların beklenen antimikrobiyel etkinliği gösterememelerine yol açabileceği ifade edilmektedir (141, 420).

Uçucu yağ etkinliklerinin gıdaların fiziksel yapılarına göre değişkenlik gösterebildiği bildirilmektedir. Örneğin kekik yağının *Salmonella* Typhimurium üzerine gösterdiği etkinliklerin araştırıldığı bir çalışmada (422) broth ve jelatin ortamında farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir. Broth ortamında uçucu yağ etkinliğinin jelatine oranla daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Antimikrobiyel ajanların, broth ve agar ortamlarında hedef bakterilere karşı ölçülen MIC değerlerinin dahi birbirinden farklı olduğu ortaya konmuştur (385). Bu durum, çalışmada *in vitro* ortamda belirlenen uçucu yağ MIC değerlerinin sucuk ortamında niçin aynı etkiyi gösteremediğini açıklamak açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışmada incelenen tüm sucuk gruplarında kontrollü olarak gerçekleştirilen olgunlaşma esnasında kademeli olarak pH düşüşü şekillendiği ortaya konmuştur. Türk Gıda kodeksi Et ürünleri Tebliği'nde fermente sucuk için pH'nın en çok 5.4 olması gerektiği belirtilmiştir (41). Genel olarak sucuklarda pH'nın düşüşü, ürünü mikrobiyolojik olarak daha güvenli hale getirmekte ve ürünün organoleptik özelliklerini ve kalitesini pozitif yönde etkilemektedir. Çalışmamızda olgunlaşma sonrası pH'nın 4.82-4.91 düzeylerinde olması son ürünün pH açısından istenilen özellikte olduğunu göstermektedir. Çalışmada incelenen 300 ppm ve 500 ppm bitki ekstraktı ilaveli sucuk grupları ile kontrol grupları arasında pH değişimi ile ilgili istatistiki açıdan önemli bir fark şekillenmemiştir (300 ve 500 ppm düzeylerinde katılan gruplar için sırasıyla, $p=0.065$; $p=0.950$). Deneysel olarak katılan düzeylerdeki uçucu yağın, fermentasyondan sorumlu starter kültür üreme eğrileri üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı dolayısıyla pH üzerine de etkili olmadığı görülmektedir.

Olgunlaşma ve muhafaza esnasında şartlara bağlı olarak sucukların KM oranları artış göstermektedir. Bu çalışmada üretilen deneysel sucuk gruplarında da KM oranı kademeli olarak yükselmiştir. Çalışma kapsamında sucuklara farklı düzeylerde eklenen uçucu yağın sucuk KM oranında istatistiki açıdan bir fark oluşturmadığı, muhafaza ve olgunlaşma sürelerinde KM oranlarının gruplara göre farklı olmadığı belirlenmiştir ($p=0.96$; $p=0.518$). Yapılan bir çalışmada (5) %50.20-50.25 düzeylerinde olan rutubet oranının gruplarda düzenli düşüş göstererek muhafazanın son gününde % 36.10-37.0

aralığına gerilediği tespit edilmiştir. Bu sonuç, bizim çalışmamızdaki KM değişimi ile paralellik göstermektedir.

Et ürünlerinde yağ oksidasyonu önemli bir kalite parametresi olarak değerlendirilmektedir (423). Et ürünlerindeki lipitler fermentasyon ve olgunlaşma süresi boyunca lipolizis ve oksidasyon olmak üzere iki temel reaksiyona maruz kalmaktadır. TBA değeri de et ürünlerinde yağların oksidasyonu sonucu oluşan malonaldehit miktarının belirtecidir. Starter kültür olarak kullanılan *Staphylococcus* türleri genellikle lipolitik aktiviteye sahiptirler (407). Lipoliz neticesinde oluşan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu fermente et ürünlerine karakteristik tat ve koku niteliklerini kazandıran bileşikler oluşmaktadır. Sucuk ortamındaki lipit oksidasyonunda; hamurun kompozisyonu, etin parçalanma derecesi, pH ve kullanılan katkı maddeleri (tuz, nitrit, baharat, antioksidan vb.) gibi değişik faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Üründe ransiditeye bağlı olarak istenmeyen tat oluşturacağından sucuk hamurunda sınırlı derecede bir lipit oksidasyonu arzu edilmektedir (424). Çalışmada farklı grupların olgunlaşma sonrası içerdikleri TBA oranları Tablo 24’de verilmiştir. Çalışmada oluşturulan uçucu yağ ilaveli deneysel sucuk grupları ve kontrol grubu arasında TBA değeri bakımından istatistiki açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir ($p=0.808$; $p=0.225$).

Çalışma kapsamında Türkiye’de zahter olarak bilinen ve oldukça yaygın bir bitki olan *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* ’ya ait uçucu yağ, fermente sucuklara deneysel olarak 300 ppm ve 500 ppm düzeylerinde katılmış ve toplamda 3 farklı sucuk formülasyon grubu organoleptik muayeneye tabi tutulmuştur. Bu sonuçlara göre en çok beğenilen grup, kontrol grubu olurken, 500 ppm düzeyinde uçucu yağ katılmış sucuklar en az beğeniyi almıştır. Lezzet ve koku üzerindeki olumsuz etkileri dolayısıyla uçucu yağların gıdalara arzu edilen antimikrobiyel etkinliği sağlayacak miktarlarda katılamaması, söz konusu uçucu yağın sucuk yapımında kullanılması önündeki en büyük problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Uçucu yağlar, elde edildikleri bitkiye has koku ve aromayı konstantre halde barındırmalarından dolayı gıdalara katıldıklarında kabul edilebilenin çok üzerinde organoleptik değişikliklere neden olmaktadır (344, 425, 426).

Sonuç olarak zahter uçucu yağının, *in vitro* koşullarda çalışmada test edilen patojenlere karşı etkili olduğu, bununla birlikte fermente Türk sucuğuna antimikrobiyel etki

gösterebilecek miktarlarda ekstraktın katılması durumunda, ürünün duyuşal kabul edilebilirliğinin olumsuz yönde etkilendiği tespit edilmiştir. Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılması amacıyla doğal antimikrobiyellerin gıda teknolojilerinde gıda katkı maddelerine alternatif olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Arslan A. Et muayenesi ve et ürünleri teknolojisi. Malatya, Medipress Yayıncılık, 2013.
2. Buckley DJ, Morissey PA, Gray JI. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *J Anim Sci* 1995; 73: 3122-30.
3. Baysal A. Beslenme (9. baskı). Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 2002.
4. Atik A. Keçi etlerinin sucuk üretiminde değerlendirilmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2013.
5. Ulusoy HB. Kefir kültürü ile fermente sucuk üretimi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2007.
6. Atasever M, Keleş A, Güner A, ve ark. Konya’da tüketime sunulan fermente sucukların bazı kalite nitelikleri. *Vet Bil Derg* 1998; 14(2): 27-32.
7. Öksüztepe G, Güran Ş, İncili GK. Elazığ’da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg* 2011; 25(3): 107-114.
8. Ercoşkun H, Özkal SG. Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation, *Food Control* 2011; 22: 165-172.
9. Sancak YC, Kayaardı S, Sagun E, ve ark. Van piyasasında tüketime sunulan fermente Türk sucuklarının fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve organoleptik niteliklerinin incelenmesi. *Y.Y.O. Vet. Fak. Derg* 1996; 7(1-2): 67-73.
10. Nazlı B, Şenol A. Researches on microbiological decomposition of Turkish fermented sausages. *Turkish J Vet Anim Sci* 1997; 21: 487-492.

11. Kök F, Gökben Ö, Muz A. Aydın ilinde satışa sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. Fırat Üniv Sağ Bi Derg 2007; 21(6): 249-252.
12. Ertaş N, Abay S, Telli N, ve ark. Presence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. in retailed sausages in Kayseri, Turkey. Fırat Üniv Sağ Bil Derg 2014; 28 (1): 25-28.
13. Gönülalan Z, Arslan A, Köse A. Farklı starter kültür kombinasyonlarının fermente sucuklardaki etkileri. Turkish J Vet Anim Sci 2004; 28: 7-16.
14. Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol 2008; 25(1): 207-211.
15. Hernandez D, Cardell E, Zarate V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocinlike substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. J Appl Microbiol 2005; 99(1): 77-84.
16. Bingöl EB, Bostan K. Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages. Turkish J VetAnim Sci 2007; 31(5): 333-339.
17. Oflaz S, Kürkçüoğlu M, Başer KHC. *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. 14. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, bildiriler, 29-31 Mayıs 2002. Eskişehir.
18. Başer KHC, Özek T, Tümen G, Sezik E. Ticari önemi olan Türk *Origanum* türlerinin uçucu yağları. TAB Bülteni 1994; 10: 28-30.
19. Baytop T. Türkiye’de bitkilerle tedavi geçmişte ve bugün. İlaveli ikinci baskı, Nobel Yayınları, 1999.
20. Kıvanc M, Akgul A. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour Fragr J 1986; 1: 175-179.
21. Baydar H, Sagdic O, Özkan Karadoğan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control 2004; 15: 169-172.

22. Kilic T. Analysis of essential oil composition of *Thymbra spicata* var. *spicata*: antifungal, antibacterial and antimycobacterial activities. Zeitschrift Für Naturforschung C 2006; 61: 324-328.
23. Konyalıoğlu S. Et kalitesi üzerine diyetle alınan E vitamininin etkileri. Hayvansal Üretim 2001; 42(2): 25-36.
24. Atasever A. Spor ve beslenme. MEB Ders Kitapları Dizisi. Birinci Baskı. Ankara, 2003.
25. Ertürk YE, Sibel T. Türkiye’de et ve et mamüllerinin arz, talep ve dış ticaret dengesi. Türkiye I. Besi ve Süt Hayvancılığı Sempozyumu Bildirileri 2-3 Aralık 1999, Menemen/İzmir.
26. Erol İ. Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi. Birinci Baskı. Ankara, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., 2007.
27. Erkmen O. Survival of *Staphylococcus aureus* and aerobic bacteria in sucuks made from starter culture and *Thymbra spicata* during manufacturing and storage. Food Bioprod Process 2009; 87(1): 62-67.
28. Karakaş G. Tokat ili kentsel alanda et ve et ürünleri tüketiminde tüketici kararlarını etkileyen faktörlerin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
29. Alkan M, İstanbulluoğulları E. III. Türk Veteriner Hekimliği Kurultayı Komisyon Raporları, 2010.
30. Vanne L, Karwoski M, Karpinen S, ve ark. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. Food Control, 1996; 7: 263-276.
31. Tauxe RV, Doyle MP, Kuchenmüller T, et al. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. Int J Food Microbiol 2010; 139: 16-28.
32. Soon JM, Singh H, Baines R. Foodborne diseases in Malaysia: A review. Food Control 2011; 22: 823-830.
33. Tekinşen OC, Dincer B, Kaymaz S, ve ark. Turk sucuğunun olgunlaşması sırasında mikrobiyel flora ve organoleptik nitelikleri üzerinde değişimler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1982; 2:111-130.

34. Nassu RT, Goncalves LAG, Silva MAAP, et al. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Sci* 2003; 63: 43-49.
35. Dalmış U. Sucukta üretim ve depolama sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve biyokimyasal değişimler. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı 2007.
36. Uz A. Az yağlı sucuğun renk ve tekstürüne buğday kepeği ilavesinin etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
37. Kaban G. Geleneksel olarak üretilen sucuklardan laktik asit bakterileri ile katalaz pozitif kokların izolasyonu- identifikasyonu, üretimde kullanılabilme imkanları ve uçucu bileşikler üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora Tezi 2007.
38. Zeuthen, P. Historical aspects of meat fermentation. "Fermented Meats", Ed Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. 1995; 53-69.
39. Gücükoğlu A. Türk fermente sucuğunda farklı starter kültür ve olgunlaşma sıcaklıklarının biyojen amin oluşumu üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi 2007.
40. Değirmencioğlu A, Arslan M, Gokgozoğlu, ve ark. Klasik tip ve ısıtma işlem uygulanarak olgunlaştırılan sucukların özelliklerindeki değişimleri belirlenmesi üzerine bir araştırma. Türkiye Gıda Kongresi, Bolu. 2006; 401-402.
41. Türk Gıda Kodeksi (TGK). Et ve Et Ürünleri Tebliği. TEBLİĞ NO: 2012/74, Sayı: 28488, 2012.
42. Türk Standartları Enstitüsü (TSE). Türk Sucuğu. Birinci Baskı. T.S: 1070, 1984.
43. Vural H. The use of commercial starter cultures in the production of Turkish semi-dry fermented sausages. *Food Sci Tech* 1998; 207: 410-412.
44. Campbell-Plat G. Fermented meats-A world perspective. *Fermented Meats*, Ed. Campbell-Plat G, Cook PE. Chapman and Hall, New York, 1995.
45. Kurt A. Fermente sucuk üretiminde kuru incir ve taze siyah incir kullanımı. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012.

46. Lücke KF. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Sci 2000; 56: 105-115.
47. Dincer B, Mutluer B, Erol İ, ve ark. Turk fermente sucuğuna özgü starter kültür bakterilerinin izolasyon, identifikasyon ve üretimleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1995; 42:285-293.
48. Jessen B. Starter Cultures for meat fermentations. In: Fermented Meats, Ed. Campbell-Platt G, Cook PE. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 1995.
49. Alperden I, Nazlı B. Gıda teknolojisinde starter kültürlerin önemi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1998; 15: 97-108.
50. Tekinşen OC, Atasever M. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 1994.
51. Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial Aktivitiy of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol 1989; 55: 1901-1906.
52. Dinçer B, Mutluer B, Erol İ, ve ark. Türk fermente sucuğuna özgü starter kültür bakterilerinin izolasyon, identifikasyon ve üretimleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1995; 42: 285-293.
53. Şimşek Z. Fermente sucuk üretiminde, fermentasyon mikroorganizmaları kaynağı olarak turşu suyunun kullanılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2010.
54. Tayar M. Yerli sucuklarımızın pastörize olarak üretilmeleri üzerine bir araştırma. Uludag Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora tezi, Bursa, 1989.
55. Hampikyan H. fermente sucuklarda nisin kullanımının *Listeria monocytogenes* üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2006.
56. Calicioglu M, Faith NG, Buege DR, et al. Viability of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacturing and storage of a fermented, semidry soudjouk-style sausage. J Food Protect 2002; 65(10): 1541-1544.

57. Demir N. Fermente sucuk üretiminde şalgam suyu kullanımının bazı patojenlerin canlılığı üzerine etkisi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, 2013.
58. Türk Gıda Kodeksi (TGK). Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Sayı: 28157 (3. Mükerrer), 2011.
59. Barut NB, Ates M. Değişik et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* rastlanma sıklığı ve mikrobiyal kalitenin belirlenmesi. Gıda 2004; 5: 75-79.
60. Erdoğan Ö, Ergün Ö. Kahramanmaraş piyasasında tüketilen sucukların bazı fiziksel, kimyasal, duyu ve mikrobiyolojik özellikleri. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2005; 31(1): 55-65.
61. Kök F, Gökben Ö, Muz A. Aydın ilinde satışa sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. Fırat Üniv Sağ Bil Derg 2007; 21(6): 249-252.
62. Balpetek D, Gürbüz Ü. Bazı et ürünlerinde *E. coli* O157:H7 varlığının araştırılması. Eurasian J Vet Sci 2010; 26: 25-31.
63. Ozbey G, Kok F, Muz A. Isolation of *Salmonella* spp. in camel sausages from retail markets in Aydın, Turkey, and polymerase chain reaction (PCR) Confirmation. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 67-71.
64. Coşansu S, Athan K. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain in Turkish soudjouck during fermentation, drying and storage periods. Meat Sci 2000; 54: 407-411.
65. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli* unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 83-98.
66. Jian-Guo XU, Bo-Kun C, Qi-Huai J. *Escherichia coli* O157:H7 and shiga-like-toxin producing *Escherichia coli* in China. World J Gastroenterol 1999; 5(3): 191-4.
67. Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. In the distribution of bacterial flora in the intestine, Academic Press, London, 1974.
68. Bell C, Kyriakides A. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. Eds: de W Blackburn, C., McClure, P. J. CRC press, 2002.

69. Naylor SW, Gally DL, Low C. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. J Food Microbiol 2005; 295: 419-41.
70. Neter E, Westphal O, Liideritz O, et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. Pediatrics 1955; 16(6): 801-808.
71. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1978; 27(1): 1119-1122.
72. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can J Microbiol 1992; 38(7): 699-704.
73. Rowe B. The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. Clin Gastroenterol 1979; 8:625-644.
74. Orskov F, Orskov I, Rees TA, et al. Two new *E. coli* O antigens: 014 and 0142 and two *E. coli* K antigens: K85 and K86. Acta Pathol Microbiol Scand 1960; 48:48-50.
75. Rowe B, Gross RJ, Lindop R, et al. A new *E. coli* O group O158 associated with an outbreak of infantile enteritis. J Clin Pathol 1974; 27:832-833.
76. Ghilardi AC, Gomes TA, Trabulsi LR. Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(5): 703-708.
77. Wang L, Huskic S, Cisterne A, et al. The O-antigen gene cluster of *Escherichia coli* O55: H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene. J Bacteriol 2002; 184(10): 2620-2625.
78. Nelson JD, Haltalin KC. Accuracy of diagnosis of bacterial diarrheal diseases by clinical features. J Pediatr 1971; 78(5): 19-522.
79. Rothbaum R, McAdams AJ, Giannella R, et al. A clinicopathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology 1982; 83: 441-454.
80. Gunvith M, Hinde D, Gross R, et al. A prospective study of enteropathogenic *Escherichia coli* in endemic diarrheal disease. J Infect Dis 1978; 137:292-297.

81. Black RE, Lopez de Romana G, Brown KH. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huscar, Peru. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 785-799.
82. Toledo MRF, Alvariza MCB, Murahovschi J, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* 1983; 39(2): 586-589.
83. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rell* 1984; 6: 31-51.
84. Cravioto A, Tello A, Villafan J, et al. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* 1991; 163: 1247-1255.
85. Hedberg CW, Savarino SJ, Besser JM, et al. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* 039:NM an agent that does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. *J Infect Dis* 1997; 176:1625-1628.
86. Neill MA, Phillip IT, Taylor DN, et al. *Escherichia coli*. In Eds: Hui, YH, Pierson MD, Gorham JR. *Foodborne Disease Handbook: Volume 1: Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker Press, 2001. pp: 169-212.
87. Echeverria P, Taylor DN, Leksomboon U, et al. Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. *J Infect Dis* 1989; 159(3): 543-548.
88. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, et al. Actin accumulation at the sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989; 57: 1290-1298.
89. Ismaili A, Philpott DJ, Dytoc MT, et al. Alpha-actinin accumulation in epithelial cells infected with attaching and effacing gastrointestinal pathogens. *J Infect Dis* 1995; 172: 1393-1396.
90. Zhang WL, Kohler B, Oswald E, et al. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4486-4492.

91. Toma C, Lu Y, Higa N, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2003; 41: 2669-2671.
92. Elliott SJ, Sperandio V, Girón JA, et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and Non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 2000; 68(11): 6115-6126.
93. Polotsky YE, Dragunskaya EM, Seliverstova VG, et al. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1977; 24(3):221-236.
94. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:1664-1668.
95. Jerse AE, Yu J, Tall BD, et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:7839-7843.
96. Blanco M, Schumacher S, Tasara T, et al. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae- η 2). BMC microbiology 2005; 5: 23.
97. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 1979; 3:95-99.
98. Giron JA, Donnenberg MS, Martin WC, et al. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Dis 1993; 168:1037-1041.
99. Knutton S, Baldini MM, Kaper JB, et al. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Infect Immun 1987; 55(1): 78-85.
100. Teixeira NB, Rojas TC, da Silveira WD, et al. Genetic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid

- reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. BMC microbial 2015; 15(1): 1.
101. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, et al. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 365-378.
 102. Black RE, Merson MH, Huq I, et al. Incidence and severity of rotavirus and *E. coli* diarrhea in rural Bangladesh. Lancet 1981; 1:141-143.
 103. Guerrant RL, Kirchhoff LV, Schields DF, et al. Prospective study of diarrheal illnesses in Northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. J Infect Dis 1983; 148: 986-997.
 104. Abu-Elyazeed R, Wierzba TF, Mourad AS, et al. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in a pediatric cohort in a periurban area of lower Egypt. J Infect Dis 1999; 179(2): 382-389.
 105. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, et al. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol 1993; 138:849-869.
 106. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, et al. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol 1990; 131: 886-904.
 107. Smith HW, Gyles CL. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J Med Microbiol 1970; 3:387-401.
 108. Li YF, Poole S, Nishio K, et al. Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(26): 10793-10798.
 109. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 569-584.
 110. Moens S, Vanderleyden J. Functions of bacterial flagella. Crit Rev Microbiol 1996; 22(2): 67-100.
 111. Nirdnoy W, Serichantalergs O, Cravioto A, et al. Distribution of colonization factor antigens among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from

- patients with diarrhea in Nepal, Indonesia, Peru, and Thailand. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 527-530.
112. Giron JA, Viboud GI, Sperandio B, et al. Prevalence and association of the longus pilus structural gene (IngA) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995; 63: 4195-4198.
 113. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(3): 465-483.
 114. Hyams KC, Bourgeois AL, Merrell BR, et al. Diarrheal disease during operation Desert Shield. *N Engl J Med* 1991; 325:1423-1428.
 115. Roels TH, Proctor ME, Robinson IC, et al. Clinical features of infections due to *Escherichia coli* producing heat-stable toxin during an outbreak in Wisconsin: a rarely suspected cause of diarrhea in the United States. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 898-902.
 116. Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, et al. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1998; 177: 662-667.
 117. Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis* 1990; 12(1): 73-79.
 118. Taylor DN, Echeverria P. Etiology and epidemiology of travelers' diarrhea in Asia. *Rev Infect Dis* 1986; 8(2): 136-141.
 119. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996; 60: 167-215.
 120. Yamamoto T, Echeveria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* 1996; 64: 1441-1445.
 121. Vila J, Gene A, Vargas M, et al. A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-I). *J Med Microbiol* 1998; 47: 889-891.

122. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol Rev 1992; 56: 622-647.
123. Guerrant RL, Hughes JM, Chang B. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *E. coli*: Studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates. J Infect Dis 1980; 142: 220-227.
124. Klipstein FA, Engert RF, Houghten RA, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. J Clin Microbiol 1984; 19: 798-803.
125. Sanchez J, Holmgren J, Svennerholm AM. Recombinant fusion protein for simple detection of *Escherichia coli* enterotoxin by GM1 enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1990; 28: 2175-2177.
126. Schultz C, Pool GJ, Vanketel R, et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2393-2397.
127. Tsen HY, Jim LZ. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin I1 and Shiga-like toxin I and I1 genes of I in water. J Appl Microbiol 1998; 84: 585-592.
128. Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J Clin Microbiol 1995; 33: 1054-1059.
129. Svennerholm AM, Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (G_{MI}-ELISA) procedure. Curr Microbiol 1978; 1:19-23.
130. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Indust Microbiol 1995; 15: 214-216.
131. Gaasatra W, van der Zeijst AM. Fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and their possible use as vaccine components. Rev Med Microbiol 1996; 7: 165-177.
132. Evans DJ, Evans DG. Noninflammatory diarrheas caused by enterotoxigenic *Escherichia Coli*, Chapter 25, *Escherichia Coli* in Diarrheal Disease, Medical

- Microbiology, 4th edition. University of Texas Medical Branch, United States of America. 1996; pp. 245-254.
133. Ewing WH, Gravatti JL. *Shigella* types encountered in the Mediterranean area. J Bacteriol 1947; 53: 191-195.
 134. Murphy GS, Bodhidatta L, Echeverria, P, et al. Ciprofloxacin and loperamide in the treatment of bacillary dysentery. Ann Intern Med 1993; 118:582-586.
 135. Prado D, Lope, E, Liu H, et al. Ceftibuten and trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* disease. Pediatr Infect Dis J 1992; 11: 644-647.
 136. Beutin L, Gleier K, Kontny I, et al. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia Coli* (EIEC) isolated in Germany. Epidemiol Infect 1997; 118: 199-205.
 137. Yamamura K, Sumi N, Egashira Y, et al. Food poisoning caused by enteroinvasive *Escherichia coli* (O164:H-)-a case in which the causative agent was identified. J Jpn Assoc Infect Dis, 1992; 66:761-768.
 138. Gordillo ME, Reeve GR., Pappas J, et al. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J. Clin Microbiol 1993; 30: 889-893.
 139. Taylor DN, Echeverria P, Pal T, et al. The role of *Shigella* spp., enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. J Infect Dis 1986; 153: 1132-1138.
 140. Echeverria P, Sethabutr O, Serichantalergs O, et al. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in households of children with dysentery in Thailand. J Infect Dis 1992; 165: 144-147.
 141. Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, et al. Clinical and microbiological features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J Clin Microbiol 1988; 26: 1362-1366.
 142. Wanger AR, Murray BE, Echeverria P, et al. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travelers with diarrhea. J Infect Dis 1988; 158:640-642.
 143. Taylor DN, Houston R, Shlim DR, et al. Etiology of diarrhea among travelers and foreign residents in Nepal. JAMA 1988; 260: 1245-1248.

144. Altwegg M, Perschil I, Gruner E. Molecular biology detection and antibiotic sensitivities of *Shigella* spp. and entero-invasive *Escherichia coli* (EIEC) in patients returning from the tropics. *Praxis* 1997; 86: 348-351.
145. Lusche D, Altwegg M. Detection of *Shigellae*, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 825-829.
146. Cheasty T, Rowe B. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O133, O152, and O164, and *Shigella* antigens. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 681-684.
147. Gross FJ, Thomas LV, Cheasty T, et al. Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O group, O167. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 521-523.
148. Toledo MRF, Trabulsi LR. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 419-421.
149. Sereny B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta Microbiol Hung* 1957; 4: 367-376.
150. Small PLC, Falkow S. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. *Infect Immun* 1988; 56: 225-229.
151. Pal T, Al-Sweih NA, Herpay M, et al. Identification of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains in pediatric patients by an IpaC-specific enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1757-1760.
152. Floderus E, Pal T, Karlsson K, et al. Identification of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains by a virulence-specific, monoclonal antibodybased enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 111-117.
153. Sansonetti PJ, d'Hauteville H, Formal SB, et al. Plasmid mediated invasiveness of "Shigella-like" *Escherichia coli*. *Am Microbiol (Paris)* 1982; 133: 351-355.
154. Hale TL, Sansonetti PJ, Schad PA, et al. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983; 40: 340-350.

155. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Rev Microbiol 2004; 2(2): 123-140.
156. Thorns CJ. Bacterial food-borne zoonoses. Rev Sci Tech 2000; 19(1): 226-39.
157. Ryan CA, Tauxe RV, Hisek GW, et al. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological and pathological findings. J Infect Dis 1986; 154: 631-638.
158. Ratnam S, March SB, Sprague WD, et al. Are humans a source of *E. coli* O157:H7, the agent of hemorrhagic colitis? N Engl J Med 1986; 315:1612-1613.
159. Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J Clin Microbiol 1990; 28: 2165-2168.
160. Gunzer F, Bohm H, Russman H, et al. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome. J Clin Microbiol 1992; 30: 1807-1810.
161. Bielaszewska M, Schmidt H, Karmali MA, et al. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7- strains in the Czech Republic. J Clin Microbiol 1998; 36: 2135-2137.
162. Doyle MP, Schoeni JP. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl Environ Microbiol 1984; 48: 855-858.
163. De Boer E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. Int J Food Microbiol 1998; 45: 43-53.
164. Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, et al. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Int J Food Microbiol 2003; 82: 273-279.
165. CDC 1997. Epidemiologic notes and reports isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis, United States. CDC MMWR Weekly 1997; 46(30): 700-704.
166. Terada K. Information about food poisoning caused by *E. coli* O157. J Infect Dis 1995; 171: 1042-5.
167. Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S, et al. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. Infect Immun 1978; 20:575-577.

168. O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet 1983; 1: 702.
169. Strockbine NA, Marques LRM, Newland JW, et al. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. Infect Immun 1986; 53: 135-140.
170. EFSA Report. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104, 2011.
171. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 142-201.
172. Watahiki M, Isobe J, Kimata K, et al. Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. J Clin Microbiol 2014; 52(8): 2757-2763.
173. Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Scand J Infect Dis 2005; 37: 405-416.
174. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. JAMA 1994; 272(17): 11349-1353.
175. Ahmed S, Donoghuy M. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. In *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga-Toxin Producing *E. coli* Strains (eds. Kaper JB, O'Brien AD), ASM Press, Washington, DC., 1998; pp. 59-65.
176. National Institute of Infectious Diseases. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection, 1996-April 1998. Infect Ag Surveill Rep 1998; 19:122-123.
177. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol Rev 1996; 18: 29-51.
178. Ostroff SM, Kobayashi JM, Lewis JH. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. JAMA 1989; 263: 355-359.

179. Pai CH, Ahmed N, Lior H, et al. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two year prospective study. *J Infect Dis* 1988; 157: 1054-1057.
180. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, et al. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 1997; 126: 505-513.
181. Spika JS, Parsons JE, Nordenberg D, et al. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center. *J Pediatr* 1986; 109:287-291.
182. World Health Organisation (WHO). *E. coli* Fact Sheet. Internet Access: December, 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
183. Ramsey PG, Neill MA. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with *Escherichia coli* O157:H7. *MMWR* 1986; 35: 549-551.
184. Morrison DM, Tyrell DLJ, Jewell LD. Colonic biopsy in Verotoxin induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Am J Clin Pathol* 1986; 86(1): 108-12.
185. Kovacs MJ, Roddy J, Grigoire S, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* 1990; 88:177-179.
186. March SB, Ratnam S. Sorbitol-Macconkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23:869-872.
187. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, et al. Novel single-tube agar-based test system for motility enhancement and immunocapture of *Escherichia coli* O157:H7 by H7 flagellar antigen-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4685-4690.
188. Desmarchelier PM, Bilge SS, Fegan N, et al. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1801-1804.
189. Wang L, Rothmund D, Curd H, et al. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1786-1790.

190. Khakharia R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 511-520.
191. Whittam TS, Wachsmuth IK, Wilson RA. Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1988; 157:1124-1133.
192. Bohm H, Karch H. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2169-2172.
193. Martin IE, Tyler SD, Tyler KD, et al. Evaluation of ribotyping as an epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 720-723.
194. Thompson CJ, Daly C, Barrett TJ, et al. Insertion element IS3-based PCR method for subtyping *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1180-1184.
195. Samadpour M. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by restriction fragment length polymorphism using shiga-like toxin genes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2150-2154.
196. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, et al. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2559-2564.
197. Shaikh N, Tarr PI. *Escherichia coli* O157: H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* 2003; 185(12): 3596-3605.
198. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, et al. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 540-545.
199. Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin 11-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* 1991; 59: 1065-1073.
200. Marques LR, Peiris JSM, Cryz SJ, et al. *Escherichia coli* strains isolated from pigswith edema disease produce a variant of Shiga-like toxin 11. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44:33-38.

201. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, et al. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* 1988; 170: 4223-4230.
202. Samuel JE, Perera LP, Ward S, et al. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant. *Infect Immun* 1990; 58: 611-618.
203. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 1987; 51: 206-220.
204. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, et al. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2440-2442.
205. Paton J, Paton A. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-479.
206. Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 1992; 6: 411-417.
207. Karmali MA, Petric M, Lim C, et al. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151(5): 775-782.
208. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, et al. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985; 48: 378-383.
209. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984; 45: 534-536.
210. Bangar R, Mamatha B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, South India. *Indian J Med Sci* 2008; 62:8-12.
211. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4185-4190.

212. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2006; 61: 1267-1282.
213. Moon JY, Park JH, Kim YB. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253: 215-220.
214. Fang GD, Lima AAM, Martins CV, et al. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 137-144.
215. Smith HR, Scotland SM, Willshaw GA, et al. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *J Infect Dis* 1994; 170: 1610-1613.
216. Huang DB, DuPont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 15: 266-271.
217. Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, et al. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 294-297.
218. Mayer HB, Wanke CA. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. *N Engl J Med* 1995; 332: 273-274.
219. Thea DM, St Louis ME, Atido U, et al. A prospective study of diarrhea and HIV-I infection among 429 Zairian infants. *N Engl J Med* 1993; 329: 1696-1702.
220. Jensen BH, Olsen KE, Struve C, et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(3): 614-630.
221. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 1996; 64: 4751-4760.
222. Andrade JA, Freymüller E, Fagundes-Neto U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. *Arq Gastroenterol* 2011; 48: 199-204.
223. Boisen N, Struve C, Scheutz F, et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 2008; 76: 3281-3292.

224. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3093-3097.
225. Wood LV, Ferguson LE, Hogin P, et al. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. Appl Environ Microbiol 1983; 46: 328-332.
226. Blaser MJ. Environmental interventions for the prevention of traveler's diarrhea. Rely Infect Dis 1986; 8(2): 142-150.
227. Doyle MP, Padhye VV. *Escherichia coli*. In Foodborne Bacterial Pathogens (ed. Doyle MP) Marcel Dekker, New York, 1989; pp. 236-281.
228. Doyle MP, Cliver DO. *Escherichia coli*, Foodborne Diseases. California: Academic Pres, Chapter 13, 1990; pp. 209-15.
229. Reiss G, Kunz P, Koin D, Keeffe EB. *Escherichia coli* O157:H7 infection in nursing homes: Review of literature and report of recent outbreak. J Am Geriatr Soc 2006; 54: 680-4.
230. Riley LW, Remis RS, Helgersen SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983; 308: 681-685.
231. Slutsker L, Ries AA, Maloney K, et al. A nation wide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. J Infect Dis 1998; 177: 962-966.
232. Parry SM, Salmon RI, Willshaw GA, et al. Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157. Lancet 1998; 351: 1019-1022.
233. Benezet A, Osa JM, Botas M, et al. Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in Spanish meat and meat product. Alimentaria 1995; 262: 51-5.
234. Caro I, García-Armesto MR. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. Int J Food Microbiol 2007; 116: 410-3.
235. Espie E, Vaillant V, Mariani-Kurkdjian P, et al. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats cheese. Epidemiol Infect 2006; 134: 143-6.
236. Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. Meat Sci 2005; 71: 676-89.

237. Oliveira M, Viñas I, Usall J, Anguera M, Abadias M. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int J Food Microbiol* 2012; 56: 133-40.
238. Zhuang YLS, Mustapha A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. *Meat Sci* 2005; 71(2): 402-6.
239. Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol* 2001; 68: 11-20.
240. Chapman PA, Ashton R. An Evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses. *Int J Food Microbiol* 2003; 87: 279-85.
241. Ünlütürk A, Turantaş F. Et ve et ürünlerinde mikrobiyolojik bozulmalar, patojen mikroorganizmalar ve muhafaza yöntemleri. eds. In: Gıda Mikrobiyolojisi. Birinci Baskı, Çınarlı, İzmir: Mengi Tan Basımevi, 1999; ss. 45-53,163-287.
242. Ackers ML, Mahon BE, Leahy E, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* 1998; 177:1588-1593.
243. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice-British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996. *MMWR* 1996; 45:975.
244. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acid foods. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3752-3755.
245. Zhao T, Doyle MP, Besser RE. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(8): 2526-2530.
246. Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 1994; 331: 579-584.

247. Olsen SJ, Miller G, Breuer T, et al. A waterborne outbreak of *E. coli* O157:H7 infections: evidence for acquired immunity. Abstracts of the 36th annual meeting, Infectious Disease Society of America, November. Denver, Abstract 783, 1998.
248. Brenner DJ. Family I. Enterobacteriaceae. In: Bergey's manual systematic bacteriology, Vol. 1 (N. R. Krieg and J. G. Holt. eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, 1984; pp. 408-420.
249. Edwards DS, Johnston AM, Mead GC. Meat inspection: an overview of present practices and future trends. *Vet J* 1997; 154:135-147.
250. Tietjen M, Fung DY. *Salmonellae* and food safety. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21: 53-83.
251. Ziprin RL. *Salmonella*. In: Foodborne Disease Handbook: Diseases Caused by Bacteria (eds. Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, and Cliver DO), Marcel Dekker, New York, 1994; pp. 253-318.
252. Anderson RC, Ziprin RL. *Salmonella*: Molecular Biology and Pathogenesis. 2007, Horizon Bioscience. Norfolk, UK. Bacteriology of *Salmonella*. In: Foodborne Disease Handbook: Volume 1: Bacterial Pathogens (Eds: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR) Marcel Dekker Press, 2001; pp: 213-263.
253. Popoff MY, Brockemuhl J, Hickman-Brenner FW. Supplement 1993 (no.38) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, 1995; 146:799-803.
254. Popoff MY, Le Minor L. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars, 6th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris. 1992.
255. Le Minor L. The genus *Salmonella*. In: The Prokaryotes. 2nd ed. (eds. Balows A, Tripper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH), Springer-Verlag, New York, pp. 1992; 2760-2774.
256. Old DC, Threlfall EJ. *Salmonella*. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. (eds. Collier L, Balows A, Sussman M), Arnold, London, 1998; pp. 969-997.
257. Quan JA, Schneider BL, Paulsen IT, et al. Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol* 2002; 148(1): 123-131.

258. D'Aoust JY, Maurer J, Bailey JS. *Salmonella* species. In: Food microbiology: fundamentals and frontiers (eds: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ), ASM Press, Washington DC (2001), pp. 141-179.
259. Smadi H, Sargeant JM, Shannon HS, et al. Growth and inactivation of *Salmonella* at low refrigerated storage temperatures and thermal inactivation on raw chicken meat and laboratory media: Mixed effect meta-analysis. J Epidemiol Glob Health 2012; 2(4): 165-179.
260. D'Aoust JY. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. Int J Food Microbiol 1991; 13: 207-216.
261. Baird-Parker AC. Foodborne salmonellosis. Lancet 1991; 336:1231-1235.
262. Bell C, Kyriakides A. *Salmonella*. In: Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. (eds: Blackburn CW, McClure PJ), CRC press. 2002; pp: 279-306.
263. Le Minor L. Genus 111. *Salmonella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (eds: Kreig NR, Holt JG), Williams and Wilkins, Baltimore. 1984; pp. 427-458.
264. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 301-303.
265. Andrews WH, Bruce VR, June G, et al. *Salmonella*. In: Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. VA, 1992; pp. 51-69.
266. Devenish JA, Ciebin BW, Brodsky MH. Novobiocin-brilliant green glucose agar: new medium for isolation of salmonellae. Appl Environ Microbiol 1986; 52:539-545.
267. Rohde PA. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5th ed. Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD, 1968.
268. Ewing WH. Isolation and preliminary identification. In: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York. 1986; pp. 27-45.
269. Vassiliadis P, Pateraki E, Papaiconomou N, et al. Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. Ann Microbiol (Paris) 1976; 127B:195-200.

270. Vassiliadis, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. *J Appl Bacteriol*, 1983; 54:69-76.
271. Vassiliadis P, Mavrommati C, Efstratiou M, Chronas G. A note on the stability of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium. *J Appl Bacteriol* 1985; 59: 143-145.
272. Barlows A. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991; pp. 371-373.
273. Greene LC, Appelbaum PC, Kellogg JA. Evaluation of a two-hour method for screening pathogens from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 285-287.
274. Cox NA, Mercuri AJ. Accuracy of Micro-ID for identification of *Salmonella* and other Enterobacteriaceae from clinical and food sources. *J Food Prot* 1979; 42: 942-945.
275. Cox NA, Mercuri AJ. Rapid confirmation of suspect *Salmonella* colonies by use of the Minitex system in conjunction with serological tests. *J Appl Bacteriol* 1976; 41(3): 389-394.
276. Kitch TT, Jacobs MR, Appelbaum PC. Evaluation of RapID onE system for identification of 379 strains in the family Enterobacteriaceae and oxidase-negative, gramnegative, nonfermenters. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 931-934.
277. Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 2015; 47: 264-276.
278. Nnalue NA, Newton S, Stocker BAD. Lysogenation of *Salmonella choleraesuis* by phage 14 increases average length of O-antigen chains, serum resistance and intraperitoneal mouse virulence. *Microb Pathog* 1990; 8: 393-402.
279. Nnalue NA, Lindberg AA. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are avirulent by oral administration. *Infect Immun* 1990; 58: 2493-2501.
280. Roantree RJ. *Salmonella* O antigens and virulence. In: *Annual review of Microbiology*, Vol. 21 (eds: Clifton CE, Raffe IS, Starr MP), Annual Reviews, Palo Alto, CA, 1967; pp. 443-466.

281. Chart H, Row B, Threlfall EJ, et al. Conversion of *Salmonella* enteritidis phage type 4 to phage type 7 involves loss of lipopolysaccharide with concomitant loss of virulence. FEMS Microbiol Lett 1989; 60: 37-40.
282. Duguid JP, Anderson ES, Alfredsson GA, et al. A new biotyping scheme for *Salmonella* Typhimurium and its phylogenetic significance. J Med Microbiol 1975; 8(1): 149-166.
283. Ayana N, Surekha K. Biotyping and phage typing of *Salmonella enterica* Serotype Typhi isolates from Kerala, South India. In: Prospects in Bioscience: Addressing the Issues (Eds. Sabu A, Augustine A), Springer India, 2012; pp. 405-410.
284. Olsen JE, Brown DJ, Baggesen DL, et al. Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Berta, and comparison of methods for typing. Epidemiol Infect 1992; 108(2): 243-260.
285. Barker R, Old DC. Differential typing of *Salmonella agona*: type divergence in a new serotype. J Hyg Camb 1982; 88: 413-423.
286. Odongo MO, McLaren IM, Smith JE, et al. A biotyping scheme for *Salmonella* Livingstone. Br Vet J 1990; 146:75-79.
287. Old DC, Munro DS, Reilly. WJ et al. Biotype discrimination of *Salmonella* montevideo. Lett Appl Microbiol 1985; 1:67-69.
288. Tuchili LM, McLaren IM, Smith JE. Differentiation of *Salmonella* Senftenberg into biogroups. Vet Rec 1991; 129: 530-531.
289. Anderson ES, Ward LR, de Saxe MJ, et al. Correlation of phage type, biotype and source in strains of *Salmonella* Typhimurium. J Hyg Camb 1978; 81: 203-217.
290. Brandis H. Die Lysotypic von Salmonellen der Enteritisgruppe mit besonderer Berücksichtigung von S. Typhimurium. Zentralbl Bakteriologie 1970; 222: 232-244.
291. Maher KO, Morris Jr JG, Gotuzzo E, et al. Molecular techniques in the study of *Salmonella* Typhi in epidemiologic studies in endemic areas: comparison with Vi phage typing. Am J Trop Med Hyg 1986; 35: 831-835.
292. Frost JA, Ward LR, Rowe B. Acquisition of a drug resistance plasmid converts *Salmonella* enteritidis phage type 4 to phage type 24. Epidemiol Infect 1989; 103: 243-238.

293. Threlfall EJ, Frost JA. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *J Appl Bacteriol* 1990; 68(1): 5-16.
294. Platt DJ, Brown DJ, Old DC, et al. Old and new techniques together resolve a problem of infection by *Salmonella* Typhimurium. *Epidemiol Infect* 1987; 99: 137-142.
295. Esteban E, Snipes K, Hird D, et al. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 233-237.
296. Nastasi A, Mammina C. Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of sporadic and outbreak-associated strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Res Microbiol* 1995; 146: 99-106.
297. Kilger G, Grimont PAD. Differentiation of *Salmonella* phase I flagellar antigen types by restriction of the amplified *flic* gene. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5): 1108-1110.
298. Suez J, Porwollik S, Dagan A, et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *Plos One* 2013; 8(3): 58449.
299. Ziprin RL, Hume MH. Human Salmonellosis: General Medical Aspects. In: *Foodborne Disease Handbook: Volume 1: Bacterial Pathogens* (eds. Hui YH, Pierson MD, Gorham JR) Marcel Dekker Press, 2001. pp: 285-321.
300. Ohashi M. Typhoid fever. In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practices Vol. 1, Bacterial, Mycotic and Parasitic Diseases* (eds. Balows A, Hausler JWJ, Ohashi M, Turano A), Springer-Verlag, New York, 1988; pp. 525-532.
301. Webber R. Typhoid. In *Communicable Diseases Epidemiology and Control*, CAB International, Wallingford, 1996; pp. 115-123.
302. Underman AE. Salmonellosis. In: *Conn's current therapy* (ed. Rakele RE), W.B. Saunders, Philadelphia, 1997; pp. 168-173.
303. Keusch GT. Salmonellosis. In: *Harrison's principles of internal medicine*, Vol. 1, 13th ed. (eds. Isselbacher KJ, Braunwald JD, Wilson JB, et al.), McGraw-Hill, New York, 1994; pp. 671-676.

304. Fang FC, Fierer J. Human infection with *Salmonella* dublin. *Medicine* 1991; 70:198-207.
305. Parry CM, Cheesbrough JS, Corcoran GD. *Salmonella* Dublin infection of a prosthetic vascular graft successfully treated with ciprofloxacin. *J Infect* 1991; 22: 175-177.
306. Reher S, Van Schil P, Rutsaert R, De Geest R. Inflammatory aneurysm of the abdominal aorta infected by *Salmonella* Dublin. *Eur J Endovasc Surg* 1995; 9:498-500.
307. McFarland WC, Stocker BA. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella* Dublin and of two strains of *Salmonella* Typhimurium. *Microb Pathog* 1987; 3: 129-141.
308. Wang J, Liu Y, Muh-Yong Y, et al. Mycotic aneurysm due to non-typhi *Salmonella*: Report of 16 cases. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 743-747.
309. Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, et al. At least four percent of the *Salmonella* typhimurium genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3372-3377.
310. Mastroeni P, Maskell, D. *Salmonella* infections: clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge University Press, 2006.
311. Finlay BB, Brumell JH. *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biol Sci* 2000; 355(1397): 623-631.
312. Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Rev Bras Cienc Avic* 2010; 12(1): 01-11.
313. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb Infect* 2000; 2(2): 145-156.
314. Morgan, E. *Salmonella* pathogenicity islands. In: *Salmonella Molecular Biology and Pathogenesis* (eds. Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J) Horizon Bioscience (2007): 67-87.
315. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella* enterica. *Int J Med Biol* 2004; 291(2-3): 95-102.

316. Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* 2009; 11(11): 1579-86.
317. Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol* 2010; 5(10): 1525-38.
318. Galan JE. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol microbiol* 1996; 20(2): 263-271.
319. Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microb Infect* 2001; 3(7): 549-559.
320. Bajaj V, Hwang C, Lee CA. hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol* 1995; 18: 715-27.
321. Alonso A, Garcia-del Portillo F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* 2004; 7(3): 181-191.
322. Zhou D, Galan J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microb Infect* 2001; 3: 1293–1298.
323. Miold S, Ehrbar K, Weissmuller. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sop E2. *J Bacteriol* 2001; 183: 2348–58.
324. Alonso A, Garcia-del Portillo F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* 2004; 7(3): 181-191.
325. Shotland Y, Kramer H, Groisman EA. The *Salmonella* SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Mol Microbiol* 2003; 49: 1565-1576.
326. Lee AH, Zareei MP, Daefler S. Identification of a NIP-SNAP homologue as host cell target for *Salmonella* virulence protein SpiC. *Cell Microbiol* 2002; 4: 739-750.
327. Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D. *Salmonella*'s long-term relationship with its host. *FEMS Microb Rev* 2012; 36(3): 600-615.
328. Kaur J, Jain SK. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res* 2012; 167(4): 199-210.

329. Nutt JD, Kubena LF, Nisbet DJ, et al. Virulence response of a *Salmonella* Typhimurium hilA: lacZY fusion strain to spent media from pure cultures of selected bacteria and poultry cecal mixed culture. J Food safety 2002; 22(3): 169-181.
330. Libby SJM, Lesnick P, Hasegawa E. et al. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. Cell Microbiol 2000; 2: 49-58.
331. Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69(4): 527-543.
332. Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. J Microbiol 2005; 43: 85-92.
333. Tiwari RP, Sachdeva N, Hoondal GS. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Basic Microbiol 2004; 44(2): 137-46.
334. Allam US, Krishna MG, Sen M. Acidic pH induced STM 1485 gene is essential for intracellular replication of *Salmonella*. Virulence 2012; 3(2): 122-35.
335. Baran Aİ, Binici İ, Demir C, ve ark. Tifo: 21 olgunun değerlendirilmesi. Van Tıp Derg, 2011; 18: 36-40.
336. Levine MM, Ferreccio C, Cryz S, et al. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty2la typhoid vaccine in randomised controlled field trial. Lancet 1990; 336: 891-894.
337. Butler T. Typhoid fever. In Conn's current therapy. (eds. Rakel RE), W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1997; pp. 171-173.
338. Çelik E, Yuvalı Çelik G. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. Orlab On-Line Mikrob Derg 2007; 5(2): 1-6.
339. Sofos JN, Busta FF. Antimicrobial activity of sorbate. J Food Prot 1981; 44: 614-622.
340. Wagner MK, Busta FF. Inhibition of *Clostridium botulinum* 52A toxicity and protease activity by sodium acid polyphosphate in media systems. Appl Environ Microbiol 1985; 50: 16-20.

341. Baydar H, Sağdıç O, Özkan Karadoğan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 2004; 15: 169-172.
342. Yanishlieva NV, Marinova EM. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur J Lipid SciTech* 2001; 103: 752-767.
343. World Health Organisation (WHO). Food safety and foodborne illness. World Health Organization Fact sheet 237, Geneva, 2002.
344. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94(3): 223-253.
345. The World Health Organization (WHO). Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants. Geneva, Switzerland, and WWF – World Wide Fund for Nature, Gland, Switzerland, 1993. Internet acces date: September 2016. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7150e/s7150e.pdf>.
346. Akhtar MS, Degaga B, Azam T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *IBSPR* 2014; 2(1): 1-7.
347. Van de Braak SAAJ, Leijten GCJJ. Essential Oils and oleoresins: A Survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 1999; p. 116.
348. Boyle W. Spices and essential oils as preservatives. *Am Perfum Essent Oil Rev* 1955; 66: 25-28.
349. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian* *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 130-135.
350. Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 421-424.
351. Bishop CD. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J Essent Oil Res* 1995; 7: 641- 644.

352. Mari M, Bertolini P, Pratella GC. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 761-766.
353. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 2001; 64: 373-378.
354. Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CML, et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2002; 109(1-2): 59-63.
355. Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, et al. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1111-1115.
356. Mahmoud SS, Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 2002; 7(8): 366-373.
357. Van Welie RTH. Alle cosmetica ingredienten en hun functies. Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein, 1997; p. 126.
358. Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Jpn J Pharmacol* 1987; 44: 77-84.
359. Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88: 170-175.
360. Ilsley S, Miller H, Greathead H, et al. Herbal sow diets boost pre-weaning growth. *Pig Progress* 2002; 18(4): 8-10.
361. Nychas GJE. Natural antimicrobials from plants. In: *New Methods of Food Preservation* (ed. Gould GW), Blackie Academic and Professional, London, 1995. pp. 58-89.
362. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, et al. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital J Food Sci* 2001; 13(1): 65-75.
363. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1914-1920.

364. Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269(11): 8022-8028.
365. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453-462.
366. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26: 194-198.
367. Juliano C, Mattana A, Usai M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J Essent Oil Res* 2000; 12: 516-522.
368. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-316.
369. Denyer SP, Hugo WB. Mechanisms of antibacterial action-A summary. In: *Mechanisms of Action of Chemical Biocides* (eds. Denyer SP, Hugo WB), Blackwell, Oxford, 1991; pp. 331-334.
370. Sikkema J, De Bont JAM., Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995; 59(2): 201-222.
371. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol* 2000; 174(4): 233-238.
372. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res* 1989; 1: 119-128.
373. Juven BJ, Kanner J, Schved F, et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994; 76: 626-631.
374. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Protect* 1995; 58(3): 280-283.
375. Baser KHC. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl Chem* 2002; 74: 527-545.

376. Fakılı O. Türkiye’de kekik adı ile anılan bitkiler konusunda yapılan çalışmaların envanteri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, Yüksek Lisans Tezi 2010.
377. Akin M, OguzD, SaracogluH. Antibacterial Activity of Essential oil from *Thymbra spicata* var. *spicata* L. and *Teucrium polium* (Stapf Brig.). IRJPAS 2010; 8(9): 53-58.
378. Muller-Riebau FJ, Berger M, Yegen O, et al. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J Agr Food Chem 1997; 45(12): 4821-4825.
379. Sadıkoğlu N. Kekik olarak kullanılan türkler üzerinde farmasotik botanik araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasotik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul, 2005.
380. Hanci SS, Sahin Ş, Yılmaz L. Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. Nahrung/Food 2003; 47(4); 252-255.
381. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int J Food Microbiol 2001; 67: 187-195.
382. Ozcan M, Erkmen O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. Eur Food Res Tech 2001; 212: 658–660.
383. Pandit VA, Shelef LA. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Food Microbiol 1994; 11: 57-63.
384. Karık Ü, Öztürk M, Tinmaz AB. Türkiye dış ticaretinde tıbbi bitkiler. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay 2009; 2: 231-235.
385. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999; 86: 985-990.
386. Tekinşen OC, Doğruer Y. Her Yönüyle Pastırma. Birinci Basım, Selçuk Üniv. Basımevi, Konya, 2000.
387. Council of Europe. European Pharmacopoeia 5.0. Determination of essential oils in vegetable drugs 2005; p. 217.

388. Dussault D, Vu KD, Lacroix M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci* 2014; 96(1): 514-520.
389. Bozkurt H. Comparison of the effects of sesame and *Thymbra spicata* oil during the manufacturing of Turkish dry-fermented sausage. *Food Control* 2007; 18(2): 149-156.
390. Halkman, A. Kadir. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Başak Matbaacılık Limited Şti., 2005.
391. AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists, Washington, DC.
392. Tarladgis BG, Watts BM, Younnathan MT, et al. A distillation method for the quantative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 1960; 37: 44-48.
393. Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Protect* 1989; 52: 665-667.
394. Deans SG, Svoboda KP. Antimicrobial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *J Hortic Sci* 1989; 64: 205-210.
395. Akgül A, Özcan M, Chialva F, et al. Essential Oils of Four Turkish Wild-Growing Labiatae Herbs: *Salvia cryptantha* Montbr. et Auch., *Satureja cuneifolia* Ten., *Thymbra spicata* L. and *Thymus cilicicus* Boiss. et Bal. *J Essent Oil Res* 1999; 11(2): 209-214.
396. Daneshvar-Royandezagh S, Khawar KM, et al. In vitro micropropagation of garden thyme (*Thymbra spicata* L. var. *spicata* L.) collected from southeastern Turkey using cotyledon node. *Biotechnol Biotechnol Eq* 2009; 23(3): 1319-1321.
397. Markovic T, Chatzopoulou P, Šiljegović J, et al. Chemical analysis and antimicrobial activities of the essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components. *Arch Biol Sci* 2011; 63(2): 457-464.
398. Ünlü M, Vardar-Ünlü G, Vural N, et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata* L. from Turkey. *Nat Prod Res* 2009; 23(6): 572-579.

399. Cowan MM. Plant products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4):564-582.
400. Sağdıç O, Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control 2003; 14(3): 141-143.
401. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat protoc 2008; 3(2): 163-175.
402. Yıldırım Y. Antimikrobiyel duyarlılık testleri; ilgili metodlar, sonuçların yorumlanması ve kanatlılarda bulunan bazı bakterilerdeki dirençlilik. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2010; 7(2): 117-129.
403. Sarac N, Ugur A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. Eurasia J Biosci 2007; 4: 28-37.
404. Hugas M, Monfort JM. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chem 1997; 59(4): 547-554.
405. Kröckel L. Bacterial fermentation of meat. In: Fermented Meats, (eds. Campbell-Plat G. Cook PE), Chapman and Hall, New York, NY, 1995; pp. 69-109.
406. Erkkila S, Petäjä E, Eerola S, et al. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Sci 2001; 58: 111-116.
407. Lucke FK. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. Fleischwirtschaft 1986; 66(10): 1505-1509.
408. Pidcock K, Heard GM, Henriksson A. Application of nontraditional meat starter culture in production of Hungarian salami. Int J Food Microbiol 2002; 76: 75-81.
409. Hammes PW, Hertel C. New developments in meat starter cultures. Meat Sci 1998; 49: 125-138.
410. Johansson G, Berdagué JL, Larsson M, et al. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. Meat Sci 1994; 38: 203-218.
411. Soyer A, Ertas HE, Üzümcüoğlu Ü. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages. Meat Sci 2005; 69: 135-141.

412. Çolak H, Uğur M. Farklı muhafaza sıcaklığı ve süresinin fermente sucuklarda biyojen aminlerin oluşumu üzerine etkisi. Turkish J Vet Sci2002; 26: 779-784.
413. Smid EJ, Gorris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Handbook of Food Preservation (ed.Rahman MS), Marcel Dekker, New York, 1999; pp. 285-308.
414. Shelef LA. Antimicrobial effects of spices. J Food Safety 1984; 6(1): 29-44.
415. Mendoza-Yepes MJ, Sanchez-Hidalgo LE, Maertens G, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. J Food Safety 1997; 17: 47-55.
416. Gill AO, Delaquis P, Russo P, et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int J Food Microbiol 2002; 73: 83-92.
417. Aureli P, Costantini A, Zolea S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J Food Protect 1992; 55(5): 344-348.
418. Pol IE, Mastwijk HC, Slump RA, et al. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. J Food Protect 2001; 64(7): 1012-1018.
419. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol 2001; 18: 463-470.
420. Tassou C, Drosinos EH, Nychas GJE. Effects of essential essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. J Appl Bacteriol 1995; 78: 593-600.
421. Mejlholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Lett Appl Microbiol 2002; 34: 27-31.
422. Skandamis P, Tsigarida E, Nychas GJE. Ecophysiological attributes of *Salmonella* Typhimurium in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. World J Microbiol Biotech 2000; 16: 31-35.
423. Toldra F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. Meat Sci 1998; 49(1): 101-110.

424. Ordonez JA, Hierro EM, Bruna JM, et al. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1999; 39(4): 329-367.
425. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 2010; 21: 1199-1218.
426. Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 5987-6000.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Serhat AL

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi ve Yeri: 24 Temmuz 1987, Diyarbakır

Medeni Durumu: Evli

Tel: +903522076666; Dahili: 29788

E-posta: serhatal@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı, 38039 Melikgazi/ KAYSERİ-TÜRKİYE

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce