



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**MARULLARDA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* VARLIĞI, YIKAMA
SOLÜSYONLARI VE MODİFİYE ATMOSFER PAKETLEMENİN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
DOKTORA TEZİ**

MELİKE NUR TOSUN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

ÇANAKKALE – 2022



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**MARULLARDA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* VARLIĞI, YIKAMA
SOLÜSYONLARI VE MODİFİYE ATMOSFER PAKETLEMENİN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MELİKE NUR TOSUN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bağımsız Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2021-3454

ÇANAKKALE – 2022



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Melike Nur TOSUN tarafından Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA yönetiminde hazırlanan ve **18/08/2022** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Marullarda Clostridium difficile Varlığı, Yıkama Solüsyonları ve Modifiye Atmosfer Paketlemenin Etkisinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

(Danışman)

Prof. Dr. Cengiz CANER

Prof. Dr. Alper AKÇALI

Prof. Dr. İlkin YÜCEL ŞENGÜN

Doç. Dr. Ayşe Handan BAYSAL

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 18/08/2022

Doç. Dr. Yener PAZARCIK
Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Melike Nur TOSUN

18/08/2022

TEŞEKKÜR

Uzun yıllardır çalışmalarım boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, her çalışmayı heyecanla planladığımız saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA'ya,

Modifiye atmosfer paketlemedeki deneyimi ve bilgisini benimle paylaştığı için ve tezin şekillenmesine yardımcı olduğu için Prof. Dr. Cengiz CANER'e, tez izleme komite toplantılarında deneyim ve bilgisini benimle paylaşan ve tezin şekillenmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Alper AKÇALI'ya, paketleme sırasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Murat ZORBA'ya, GC-FID-MS çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Serkan SELLİ ve Öğr. Gör. Onur SEVİNDİK'e, çalışmamda kullandığım yağların temininde yardımcı olan Arş. Gör. Murat BERBER'e, destekleri için YÖK ve TÜBİTAK'a, analizler boyunca stresi birlikte göğüslediğim laboratuvar çalışma arkadaşlarım Gizem TAYLAN ve Gizem KORKMAZER'e

Çalışmam boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen, düştüğümde kaldıran, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan annem Solmaz TOSUN, babam Mehmet TOSUN ve kardeşim S. Yiğit TOSUN'a, uzun ve stresli, gözyaşının eksik olmadığı bu yolda sabrım ve azmim için kendime,

Burada ismini saymadığım çalışmam boyunca gerek analizlerde gerek motivasyonumun korunmasında en küçük katkısı olana herkese sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Melike Nur TOSUN
Çanakkale, Ağustos 2022

ÖZET

MARULLARDA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* VARLIĞI, YIKAMA SOLÜSYONLARI VE MODİFİYE ATMOSFER PAKETLEMENİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Melike Nur TOSUN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

18/08/2022, 165

Çalışmamızda 107 marul örneğinde *C. difficile* varlığı tespit edilememiştir. Doğal maddelerin *C. difficile* ATCC 700057, 43593, 1870, 9689, *C. perfringens* ATCC 12915 ve *C. sporogenes* ATCC 11437'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri agar kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiş ve en yüksek zon tarçın esansiyel yağı (TEY) ve çay ağacı esansiyel yağlarında (ÇEY) gözlenmiştir. Etkili bulunan yağların MİK değerleri 0,39-12,5 (% v/v) arasında değişkenlik göstermiştir. Tarçın ve çay ağacı yağlarının uçucu yağ profilleri GC-FID-MS ile belirlenmiş ve temel bileşenler tarçın yağında sinnamealdehit (%85,64), çay ağacı yağında 4-terpineol (%83,60) olarak belirlenmiştir. TEY-vankomisin arasındaki sinerjistik aktivite dama tahtası ile belirlenmiş ve FİK değeri 0,51 olarak tespit edilmiştir. TEY ve ÇEY'in tüm konsantrasyonlarının *C. difficile*'ye karşı antibiyofilm aktivite sergilediği saptanmıştır. TEY'in *C.difficile*'ye karşı sporisidal aktivitesinin matematiksel modellemesi yapılmış ve veriler en iyi Modifiye Gompertz eşitliği ile tanımlanmıştır. TEY ile asetik asit kombinasyonu (TEY-AA) arasında sinerjistik aktivite belirlenmiştir. 2xMİK (%0,76 TEY+%0,5 AA) konsantrasyondaki TEY-AA'nın 5 dk uygulaması ile 50 ppm NaOCl'nin 15 dk uygulanması marullara inoküle edilen *C. difficile*'nin uzaklaştırılmasında ve marulların fiziksel, kimyasal özelliklerinin korunmasında en etkin parametreler olmuştur. Modifiye atmosfer paketlenen marullarda inoküle edilen *C. difficile* sporları 1,3,5,7 ve 10. günlerde canlılığını korumuş fakat azalan O₂ konsantrasyonuna rağmen çimlenme gözlenmemiştir.

Tarçın esansiyel yağının *C. difficile* enfeksiyonlarında önleyici veya tedaviye destek ajan olarak kullanılma potansiyeli değerlendirilebilir. Aynı zamanda sporisidal aktivitesinden dolayı sağlık hizmetleri gibi *C. difficile* açısından riskli olan ortamlarda ve sebzelerin dekontaminasyonunda klora alternatif dezenfektan olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, Tarçın esansiyel yağı, Sporisidal aktivite, Yıkama solüsyonu, Modifiye atmosfer paketlenme



ABSTRACT

DETECTION OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN LETTUCE AND DETERMINATION OF THE EFFECT OF WASHING SOLUTIONS AND MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING

Melike Nur TOSUN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Food Engineering

Advisor: Assoc. Professor Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

18/08/2022, 165

In our study, the presence of *C. difficile* could not be detected in 107 lettuce samples. Antibacterial activities of natural substances against *C. difficile* ATCC 700057, 43593, 1870, 9689, *C. perfringens* ATCC 12915 and *C. sporogenes* ATCC 11437 were determined by agar well and disc diffusion methods, and the highest zone was observed in cinnamon essential oil (TEY) and tea tree essential oils (TEA). The MIC values of the oils found to be effective varied between 0,39-12,5 (% , v/v). Essential oil profiles of cinnamon and tea tree oils were determined by GC-FID-MS and the main components were determined as cinnamaldehyde (85,64%) in cinnamon oil and 4-terpineol (83,60%) in tea tree oil. The synergistic activity between TEY and vancomycin was determined by checkerboard and the FIC value was determined as 0,51. All concentrations of TEY and TEY were found to exhibit antibiofilm activity against *C. difficile*. Mathematical modeling of the sporicidal activity of TEY against *C. difficile* was performed and the data were best described by the Modified Gompertz equation. Synergistic activity was determined between TEY and acetic acid combination (TEY-AA). The most effective parameters for the removal of *C. difficile* inoculated into lettuce and the preservation of the physical and chemical properties of lettuce. has been. *C. difficile* spores inoculated in modified atmosphere packed lettuce preserved their viability on days 1,3,5,7 and 10, but no germination was observed despite the decreasing O₂ concentration.

The potential of using cinnamon essential oil as a preventive or adjunctive agent in *C. difficile* infections can be evaluated. At the same time, due to its sporicidal activity, it can be used as an alternative disinfectant to chlorine in environments where there is a risk for *C. difficile*, such as health care services, and in the decontamination of vegetables.

Keywords: *Clostridium difficile*, Cinnamon essential oil, Sporicidal activity, Washing solution, Modified atmosphere packaging



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sebzelerin Çevresel Faktörler ile Kontaminasyonu	5
2.1.1. Sulamanın Kontaminasyona Etkisi	6
2.1.2. Gübre Kullanımının Kontaminasyona Etkisi.....	7
2.2. <i>Clostridium Spp</i>	8
2.3. <i>Clostridium difficile (Clostridioides difficile)</i>	9
2.3.1. <i>C. difficile</i> ile İlişkili Hastalıklarda Risk Faktörleri.....	9
2.3.2. Virülans Faktörleri.....	9
Toksin.....	10
Endospor.....	11
Tutunma (Adherans Faktörleri).....	12
2.3.3. Patojenite.....	14
2.3.4. <i>C. difficile</i> 'nin Antibiyotik Direnci.....	14
2.4. <i>C. difficile</i> 'nin Çevresel Kaynaklardaki Varlığı.....	17
2.5. <i>C. difficile</i> 'nin Hayvanlardaki Varlığı.....	19

2.6.	<i>C. difficile</i> 'nin Gıdalardaki Varlığı.....	19
2.6.1.	Sebzelerde <i>C. difficile</i> Varlığı.....	20
2.7.	Doğal Maddelerin <i>C. difficile</i> Antimikrobiyal Aktivitesi.....	23
2.8.	Yıkamanın Sebzelerin Mikrobiyal Kalitesine Etkisi.....	24
2.9.	Modifiye Atmosfer Paketleme.....	26

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.	Araştırma Planı.....	29
3.2.	Araştırma 1. Marullarda <i>C. difficile</i> Varlığının Belirlenmesi.....	30
3.2.1.	Materyal.....	30
3.2.2.	İzolasyon.....	30
3.2.3.	İzolatların Tanımlanması.....	31
	MADI-TOF MS.....	31
	API 32A.....	32
3.2.4.	İzolatların Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi.....	33
3.3.	Araştırma 2. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile <i>C. difficile</i> Vejetatif Formunun Kontrolü	33
3.3.1.	Kullanılan Mikroorganizmalar.....	33
3.3.2.	Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Maddeler.....	34
3.3.3.	Agar Kuyucuk Yöntemi.....	35
3.3.4.	Disk Difüzyon Yöntemi.....	36
3.3.5.	Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
3.3.6.	Dama Tahtası Sinerji Testi.....	37
3.3.7.	Esansiyel Yağların Antibiyofilm Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	38
3.3.8.	Esansiyel Yağların Uçucu Yağ Profillerinin GC-FID-MS ile Belirlenmesi.....	40
3.4.	Araştırma 3. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile <i>C. difficile</i> Sporlarının Kontrolü.....	41
3.4.1.	Kullanılan Mikroorganizmalar.....	41
3.4.2.	Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Maddeler.....	41
3.4.3.	Spor Solüsyonlarının Eldesi.....	42
3.4.4.	Antimikrobiyal Maddelerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	43
3.4.5.	Sporisidal Aktivite.....	43

3.4.6.	Sporisidal Aktivitenin Matematiksel Modellemesi.....	44
	Log-Linear Model.....	44
	Weibull Model.....	45
	Modifiye Gompertz Eşitliği.....	46
	Modellerin Karşılaştırılması.....	46
3.4.7.	Tarçın Esansiyel Yağı-Asetik Asit Kombinasyonunun Sinerjistik Aktivitesinin ve MİK Değerinin Belirlenmesi.....	46
3.5.	Araştırma 4. Yıkamanın Maruldaki <i>C. difficile</i> Sporları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	47
3.5.1.	Materyal.....	47
3.5.2.	Marul İnokülasyonu.....	47
3.5.3.	Marulların Yıkanması.....	47
3.5.4.	Marullara İnoküle Edilen <i>C. difficile</i> 'nin Geri Kazanılması.....	50
3.5.5.	Toplam Bakteri Yükünün Belirlenmesi.....	50
3.5.6.	Enterobacterales Yükünün Belirlenmesi.....	50
3.5.7.	Kontrol Marul Örneklerinde Fiziksel ve Kimyasal Analizler.....	50
	Renk Analizi.....	52
	Tekstür Analizi.....	52
	pH.....	53
	Suda Çözünür Kuru Madde.....	53
	Ağırlık Kaybı.....	53
	Toplam Fenolik Madde.....	54
3.6.	Araştırma 5. Yıkanan Marulların Modifiye Atmosfer Paketleme ile Depolanmasının <i>C. difficile</i> Sporları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	55
3.6.1.	Materyal.....	55
3.6.2.	Marul İnokülasyonu.....	55
3.6.3.	Marulların Yıkanması.....	55
3.6.4.	Modifiye Atmosfer Paketleme.....	55
3.6.5.	<i>C. difficile</i> Sayımı.....	55
3.6.6.	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri ve Enterobacterales sayımı.....	55
3.6.7.	Modifiye Atmosfer Paketlenen Marulların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	57
3.7.	İstatistiksel Analizler.....	59

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.	Araştırma 1. Marullardan <i>C. difficile</i> Varlığı.....	60
4.1.1.	Marullardan Elde Edilen İzolatlar ve Antibiyotik Direnç Profilleri....	60
4.2.	Araştırma 2. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile <i>C. difficile</i> Vejetatif Formunun Kontrolü.....	63
4.2.1.	Agar Kuyucuk ve Disk Difüzyon İnhibisyon Zonları.....	63
4.2.2.	Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK ve MBK Değerleri.....	72
4.2.3.	Yağların Uçucu Yağ Profilleri.....	73
4.2.4.	Dama Tahtası Sinerji Testi.....	75
4.2.5.	Yağların Antibiyofilm Yenetekleri.....	77
4.3.	Araştırma 3. Doğal Antimikrobiyal Maddelerin <i>C. difficile</i> Sporları Üzerindeki Etkisi.....	79
4.3.1.	Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK Değerleri.....	79
4.3.2.	Sporisidal Aktivitenin Matematiksel Modellemesi.....	81
4.3.3.	Tarçın Esansiyel Yağı-Asetik Asit Kombinasyonunun Sinerjistik Etkisi ve MİK Değeri.....	89
4.4.	Araştırma 4. Yıkama Solüsyonlarının Marulların Mikrobiyal Yüküne ve Fiziksel/Kimyasal Özelliklerine Etkisi.....	90
4.4.1.	Marullara İnoküle Edilen <i>C. difficile</i> 'nin Yıkama Solüsyonları ile Uzaklaştırılması.....	90
4.4.2.	Yıkamanın Marullardaki Toplam TMAB ve Enterobacteriales Yüküne Etkisi.....	93
4.4.3.	Yıkama Solüsyonlarının Marulların pH ve SÇKM Özelliklerine Etkisi	99
4.4.4.	Yıkama Solüsyonlarının Marulların Renk ve Tekstür Özelliklerine Etkisi.....	100
4.4.5.	Yıkama Solüsyonlarının marulların Toplam Fenolik Madde İçeriğine Etkisi.....	105
4.5.	Araştırma 5. Modifiye Atmosfer Paketlenen Marulların Depolama Boyunca Mikrobiyal Yükündeki ve Fiziksel/Kimyasal Özelliklerindeki Değişim	106
4.5.1.	Depolama Boyunca Marullara İnoküle Edilen <i>C. difficile</i> 'nin Değişimi.....	106
4.5.2.	Depolama Boyunca Marullardaki TMAB ve Enterobacteriales Yükünün Değişimi.....	112
4.5.3.	Depolama Boyunca Marullardaki pH ve SÇKM Değişimi.....	116
4.5.4.	Depolama Boyunca Marullardaki Renk Değişimi.....	119

4.5.5.	Depolama Boyunca Marulların Tekstüründeki Değişim.....	122
4.5.6.	Depolama Boyunca Marullardaki Su Kaybı.....	126
4.5.7.	Depolama Boyunca Marulların Toplam Fenol İçeriğindeki Değişim...	127

BEŞİNCİ BÖLÜM	129
SONUÇ ve ÖNERİLER	

KAYNAKÇA	133
ÖZGEÇMİŞ	I



SİMGELER VE KISALTMALAR

CDE	<i>Clostridium difficile</i> ile ilişkili enfeksiyon
MAP	Modifiye atmosfer paketlenme
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
FİK	Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu
TEY	Tarçın esansiyel yağı
ÇEY	Çay ağacı esansiyel yağı
AA	Asetik asit
NaClO	Sodyum hipoklorit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
BHI	Brain Heart Infusion
TSA	Tryptone soya agar
VRBG	Violet red bile glucose
CC	Cycloserine- cefoxitin
MN	Monolactam- norfloxacin
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
FID	Alev iyonizasyon dedektörü
GA	Gallik asit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
SÇKM	Suda çözünür kuru madde
N	Newton
g	Gram
%	Yüzde oranı
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
v	Hacim
kob	Koloni oluşturan birim
sn	Saniye

°C	Derece santigrat
nm	Nanometre
log	Logaritma
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
RMSE	Ortalama karakök hata
DMSO	Dimetil sülfoksit
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute- Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ATCC	American Type Culture Collection- Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
PCR	Polymerase chain reaction- Polimeraz zincir reaksiyonu
CDC	Centers for Disease Control and Prevention- Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
EFSA	The European Food Safety Authority- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	<i>C. difficile</i> enfeksiyonlarında virülans faktörleri	13
Tablo 2	<i>C. difficile</i> tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etki mekanizması	16
Tablo 3	Sebzelerde <i>C. difficile</i> bulunma sıklığı	21
Tablo 4	Doğal antimikrobiyal maddelerin dekontaminasyonda kullanıldığı bazı çalışmalar	25
Tablo 5	Kullanılan doğal antimikrobiyal maddeler	34
Tablo 6	Marullardan elde edilen izolatlar	60
Tablo 7	İzolatların MALDI-TOF MS ve API 32A ile tanımlanması	61
Tablo 8	Doğal maddelerin agar kuyucuk inhibisyon zonları (mm)	65
Tablo 9	Doğal maddelerin disk difüzyon inhibisyon zonları (mm)	69
Tablo 10	Yağların MİK ve MBK değerleri (% v/v)	73
Tablo 11	Etkin bulunan yağların uçucu yağ profilleri	74
Tablo 12	Uçucu yağlar ve vankomisin arasındaki sinerjistik aktivite	77
Tablo 13	Doğal antimikrobiyal maddelerin spora karşı MİK değerleri (% v/v)	80
Tablo 14	Tarçın yağı varlığında <i>C. difficile</i> spor canlılığı (\log_{10} kob/mL)	83
Tablo 15	Sporisidal aktivitenin Log-lineer ile modellenmesi	85
Tablo 16	Sporisidal aktivitenin Weibull ile modellenmesi	86
Tablo 17	Sporisidal aktivitenin Gompertz eşitliği ile modellenmesi	87
Tablo 18	Yıkama yapılan marullarda <i>C. difficile</i> sayımı (\log_{10} kob/g)	91
Tablo 19	Yıkama yapılan marullarda toplam mezofilik aerobik bakteri ve Enterobacteriales sayımı (\log_{10} kob/g)	95
Tablo 20	Yıkama solüsyonlarının marulların pH ve SÇKM özelliklerine etkisi	99
Tablo 21	Yıkanan marullardaki renk değişimi	101

Tablo 22	Yıkanan marulların tekstüründeki değişimler	103
Tablo 23	Yıkama solüsyonlarının marulların toplam fenol içeriğine etkisi	105
Tablo 24	İnoküle edilen ve MAP yapılan marullarda depolamaya bağlı CO2 değişimi	107
Tablo 25	İnoküle edilen ve MAP yapılan marullarda depolamaya bağlı O2 değişimi	108
Tablo 26	Depolama boyunca marullarda <i>C. difficile</i> sayısındaki değişim	110
Tablo 27	İnokülasyon yapılmayan ve MAP uygulanan marullarda depolamaya bağlı CO2 değişimi	112
Tablo 28	İnokülasyon yapılmayan ve MAP uygulanan marullarda depolamaya bağlı O2 değişimi	113
Tablo 29	Depolama boyunca marullarda TMAB sayısındaki değişim	114
Tablo 30	Depolama boyunca marullarda Enterobacterales sayısındaki değişim	115
Tablo 31	Depolama boyunca marullardaki pH değişimi	117
Tablo 32	Depolama boyunca marullardaki SÇKM değişimi	118
Tablo 33	Depolama boyunca marullarda renk değişimi	120
Tablo 34	Depolama boyunca marullarda tekstürdeki değişim	123
Tablo 35	Depolama boyunca modifiye atmosfer paketli marulların paket ağırlığındaki değişim	126
Tablo 36	Depolama boyunca marullardaki toplam fenol içeriği	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Sebzelerin kontaminasyon kaynakları	6
Şekil 2	<i>C. difficile</i> 'nin bulaşma kaynakları ve bağırsağa kolonizasyonu	14
Şekil 3	<i>C. difficile</i> tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin zaman çizelgesi	15
Şekil 4	<i>C. difficile</i> 'nin sebzelere bulaşma kaynakları	22
Şekil 5	Dekontaminasyon işlemlerinin deneysel prosedürlerini etkileyen faktörler	26
Şekil 6	<i>C. difficile</i> 'nin marullardan izolasyonu	31
Şekil 7	Marullardan <i>C. difficile</i> aranmasında inkübasyon görüntüleri	31
Şekil 8	İzolatların API 32A ile tanımlanması	32
Şekil 9	E testin yerleştirilmesi	33
Şekil 10	Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi	36
Şekil 11	Dama tahtası yönteminin şematik gösterimi	38
Şekil 12	Biyofilm analizinin akış şeması	39
Şekil 13	Antibiyofilm analizinin akış şeması	40
Şekil 14	Spor solüsyonunun eldesi	42
Şekil 15	Sporisidal aktivite	44
Şekil 16	İnoküle edilen <i>C. difficile</i> 'nin geri kazanılması çalışmaları	49
Şekil 17	İnoküle edilen marulların yıkanmasının iş-akış şeması	51
Şekil 18	Marulların tekstür özelliğinin belirlenmesi	52
Şekil 19	Marulların SÇKM değerlerinin belirlenmesi	53
Şekil 20	Gallik asit standart eğrisi	54
Şekil 21	Marulların modifiye atmosfer paketlenmesi	57
Şekil 22	Paket içindeki gaz kompozisyonunun ölçülmesi	57

Şekil 23	Modifiye atmosfer paketlenen marulların iş-akış şeması	58
Şekil 24	İzolatların mikroskop görüntüleri	61
Şekil 25	Toksinojenik olmayan <i>C. difficile</i> suşlarına karşı gözlenen agar kuyucuk inhibisyon zonları	66
Şekil 26	Toksinojenik <i>C. difficile</i> suşlarına karşı gözlenen agar kuyucuk zonları	67
Şekil 27	<i>C. sporogenes</i> ve <i>C. perfringens</i> 'e karşı gözlenen agar kuyucuk inhibisyon zonları	68
Şekil 28	Tarçın esansiyel yağının disk difüzyon ile oluşturduğu zonlar	70
Şekil 29	Dama tahtası sinerji testi	77
Şekil 30	Tarçın ve çay ağacı yağlarının <i>C. difficile</i> suşları üzerindeki antibiyofilm aktiviteleri	79
Şekil 31	Mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlenmesi	81
Şekil 32	Tarçın yağının <i>C. difficile</i> ATCC 9689 inhibisyonunun model karşılaştırması	87
Şekil 33	Tarçın yağının <i>C. difficile</i> ATCC 1870 inhibisyonunun model karşılaştırması	88
Şekil 34	Yıkamanın marullara inoküle edile <i>C. difficile</i> üzerindeki etkisi (\log_{10} kob/g)	92
Şekil 35	Yıkamanın marullardaki toplam mikrobiyal yüke etkisi (\log_{10} kob/g)	96
Şekil 36	Yıkamanın marullardaki Enterobacteriales yüküne etkisi (\log_{10} kob/g)	97
Şekil 37	Yıkamanın marulların pH ve SÇKM değişimleri	100
Şekil 38	Yıkama yapılan marullarda renk değişimi	102
Şekil 39	Yıkamanın marullardaki tekstüre etkisi	103
Şekil 40	Yıkamanın marulların fiziksel görüntüleri	104
Şekil 41	Yıkamanın marulların toplam fenol içeriğine etkisi	106
Şekil 42	<i>C. difficile</i> ile inoküle edilen marullarda depolama boyunca MAP'lardaki gaz değişimi	109
Şekil 43	Depolamaya bağlı <i>C. difficile</i> sayısındaki değişim	111

Şekil 44	<i>C. difficile</i> ile inoküle edilmeyen marullarda depolama boyunca MAP'lardaki gaz değişimi	113
Şekil 45	Depolama boyunca marulların TMAB sayısındaki değişim	114
Şekil 46	Depolama boyunca marulların Enterobacterales sayısındaki değişim	116
Şekil 47	Depolama boyunca marullarda pH değişimi	117
Şekil 48	Depolama boyunca marullarda SÇKM değişimi	118
Şekil 49	Depolama boyunca marulların L değerindeki değişim	120
Şekil 50	Depolama boyunca marulların a değerindeki değişim	121
Şekil 51	Depolama boyunca marulların b değerindeki değişim	121
Şekil 52	Depolama boyunca marulların tekstüründeki değişim	123
Şekil 53	4°C'de depolama boyunca marullardaki fiziksel değişim	124
Şekil 54	10°C'de depolama boyunca marullardaki fiziksel değişim	125
Şekil 55	Depolama boyunca paketlerdeki ağırlık kaybı	126
Şekil 56	Depolama boyunca marulların toplam fenol içeriği	128

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Clostridium (Clostridioides) difficile, uzun yıllardır hastane yatışı ve antibiyotik tedavisi sonrasında hastalarda bulaşıcı ishale neden olan nazokomiyal bir insan patojeni olarak kabul edilen, gram pozitif, sporlu anaerobik bir bakteridir (Primavilla vd., 2019). Tüm bakteriyel endosporlarda olduğu gibi *C. difficile* sporları uykudadır ve birçok dış faktöre karşı dirençlidir. Ancak koşullar uygun olduğunda, sporların çimlendiği ve vejetatif hücrelerin gelişmesiyle toksin üretmeye başladığı bilinmektedir (Rineh vd., 2014). *C. difficile* toksin A ve toksin B olarak adlandırılan iki ana toksin üretir. Toksinlerin bakterinin virülansından birincil olarak sorumlu olduğu ve antibiyotikle ilişkili gastrointestinal hastalığın patogenizinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Borriello, 1998).

C. difficile enfeksiyonu, normal kolon mikrobiyotasının bozulmasına neden olan ve etkeni bağırsak kolonizasyonuna yatkın hale getiren antimikrobiyal tedavi ile daha iyi seviyelere gelmektedir (Denève vd., 2009). Klindamisin, florokinolonlar, penisilin beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları, amoksisilin ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin bağırsağı *C. difficile* enfeksiyonuna açık hale getirdiği düşünülse de tedavide temel olarak kullanılan vankomisin ve metronidazolün dahi enfeksiyonun ilerlemesine neden olabildiği bildirilmiştir (McFarlane ve Hajkovicz, 2013).

İleri yaş (>65), antibiyotik kullanımı, hastane yatışı *C. difficile* enfeksiyonlarının temel risk faktörlerini oluşturmaktadır (Mullish ve Williams, 2018). *C. difficile*'nin hastane kaynaklı bir patojen olduğu düşünülse de toplum kaynaklı vakaların ortaya çıkması ve vakaların çoğunluğunun genetik olarak birbirinden farklı olduğunu düşündüren tüm genom dizilimi ile *C. difficile* kaynaklarının hastane dışından da olabileceğini ifade eden güçlü kanıtlar olduğu belirtilmektedir (Lim vd., 2020).

C. difficile zorunlu bir anaerob olduğu için, vejetatif hücreler aerob ortamda konakçı dışında hayatta kalamamaktadır. Çevresel stres faktörleri ile karşılaştıklarında hücreler spor forma geçmektedirler (Zhu vd., 2018). Diğer taraftan *C. difficile* zorunlu anaerob olarak bilinse de O₂ toleransını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır (Holý ve Chmelař, 2012; Kint vd., 2020; Morvan vd., 2021). Bağırsak tipik olarak anoksik olarak düşünülürken,

bağırsakta iki kesişen ve azalan oksijen gradyanı olduğu, oksijen konsantrasyonunun inceden bağırsaktan kalın bağırsağa ve bağırsaktan kolon lümenine doğru azaldığı belirlenmiştir. Disbiyozun ardından bağırsakta O₂ seviyesi artmaktadır. Oksijen indirgemesinde rol oynayan ters rubrerytrinler ve flavodiiron proteinlerinin, *C. difficile*'nin gastrointestinal sistemde karşılaşılan oksijen konsantrasyonlarını tolere etme ve hayatta kalma yeteneğinde önemli olduğu ifade edilmiştir (Kint vd., 2022).

C. difficile'nin toprak, su, gübre/kompost gibi çevresel kaynaklarda varlığı saptanmıştır. Bununla birlikte et, tavuk, süt, deniz ürünleri ve sebzelerde *C. difficile* belirlenmiştir. Özellikle yaprakları sebzelerin *C. difficile* kontaminasyonu açısından daha riskli olduğu düşünülmektedir. Yapraklı yeşil sebzelerden kaynaklanan gıda kaynaklı salgınları azaltmak için hasat sonrası sterilize etme yöntemlerine ihtiyaç vardır (Pahariya vd., 2022).

Bugüne kadar *C. difficile* ile ilişkili hastalıkların hiçbirinin zoonotik veya gıda kaynaklı olduğu rapor edilmemiştir. Fakat bu durum *C. difficile* sporlarının taşınmasında gıdaların bir araç olma potansiyeli olduğu gerçeğini değiştirmez, ancak patojenin çevresel kontaminasyon ile de edinilmesi muhtemeldir. *C. difficile*'nin çevresel yükü azaltılarak patojene karşı etkili kontrol sağlanabileceği belirtilmektedir (Warriner vd., 2017).

Dezenfeksiyon, taze kesilmiş ürünlerde son ürünün kalite ve güvenliğini ve raf ömrünü etkileyen en kritik işlemlerden biridir. Klor taze kesilmiş ürün sanayiinde en yaygın kullanılan dezenfektandır. Ancak taze kesilmiş sebzelerde patojen kontaminasyonlarıyla ilgili son salgınlar, ürünün güvenliğini sağlamada klor uygulamasının etkinliğine ilişkin endişeleri artırmıştır (Ölmez ve Kretzschmar, 2009). Ayrıca klor kullanımının yarattığı çevresel ve sağlık riskleri nedeniyle dezenfeksiyon işleminden klorun çıkarılması yönünde eğilim vardır. Bu nedenle alternatif dezenfektanlara ihtiyaç vardır (Ölmez ve Kretzschmar, 2009; Uhlig vd., 2017).

Son yıllarda tıbbi ve aromatik yağlardan elde edilen uçucu yağlar, doğal ürün oldukları ve diğer gıda koruyucuları ve dezenfektanlarla kıyaslandıklarında daha az yan etki gösterdikleri için yeni alternatif ajanlar olarak tercih edilmektedir (Santos vd., 2022). Esansiyel yağların konsantrasyonları alt inhibitör konsantrasyonlarda (sub-MİK) olsa dahi

bakterilerin tutunmasına ve ardından biyofilm oluşumuna karşı inhibisyon aktivitesi gösterdikleri bilinmektedir. İnhibitör konsantrasyonda bu doğal antibakteriyel ajanların sitoplazmik membranların lipid çift tabakasıyla etkileştiği ve bunun sonucunda hücre membranının bütünlüğünün zarar görmesine, ardından hücrel materyalin sızmasına neden olduğu öne sürülmüştür (Yu ve Shi, 2021).

Modifiye atmosfer paketleme (MAP), bir paket içindeki gıda ürününü çevreleyen gazlı atmosferin değiştirilmesini ve değişen atmosferi kabul edilebilir bir seviyede tutmak için uygun bir gaz bariyeri seviyesine sahip ambalaj malzemelerinin kullanılmasını içeren bir paketleme sistemidir (Embleni, 2013). Tüketicilere taze bir ürün sağlamak, ürünün raf ömrünü uzatmak, gıdanın mekanik özelliklerinin korunmasını sağlamak ve solunum, terleme, oksidatif stres ve mikrobiyal gelişmeyi azaltarak fayda sağlamaktadır (Firouz vd., 2021).

Modifiye atmosfer (MA) paketli gıdalar uygun depolama sıcaklıklarının korunması şartıyla güvenlidir. Uygun olmayan depolama koşulları altında Klostridya'ların gelişip toksin üretme riskleri MA paketlemenin güvenlik sorunu olarak endişeye yol açmaktadır. MAP gazlarından biri olan CO₂'nin *C. sporogenes* ve *C. perfringens* sporlarının çimlenmesini teşvik ettiği bulunmuştur (Rao ve Sachindra, 2007). MAP uygulanmış gıdalarda depolama boyunca *C. botulinum*'da gelişme ve toksin üretimi gözlenen çalışmalar mevcuttur (Claire vd., 2004; Arritt vd., 2007).

Bu tezde birbirini takip eden 5 ana araştırma planlanmıştır. Birinci araştırmada yerel pazar ve marketlerden alınan marullarda *C. difficile* varlığının araştırılması ve elde edilen izolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ile sebzelerin *C. difficile* enfeksiyonlarında risk durumunun ortaya konulması amaçlanmıştır. İkinci araştırmada doğal antimikrobiyal maddeler ile *C. difficile*, *C. sporogenes* ve *C. perfringens*'in vejetatif formunun kontrolü araştırılmış ve böylelikle *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde ve/veya önlenmesinde doğal antimikrobiyal maddelerin kullanım potansiyelinin ortaya konması amaçlanmıştır. Üçüncü araştırmada ise *C. difficile*'nin spor formunun kontrolü çalışılmış ve böylelikle çevresel ortamlarda *C. difficile* yükünün azaltılması amaçlanmıştır. Dördüncü araştırmada ise marullara inoküle edilen *C. difficile*'nin uzaklaşması için yıkama solüsyonu geliştirilmiş ve olası bir *C. difficile* kontaminasyonu sonrası kontamine marulların

tüketilerek halk sağlığını tehdit etmesinin önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Son araştırmada ise modifiye atmosfer paketli marullarda depolama ile birlikte *C. difficile* sporlarının çimlenip gelişmesi takip edilmiş ve modifiye atmosfer paketlemenin anaerobik bir patojen olan *C. difficile* için risk durumunun aydınlatılması amaçlanmıştır.



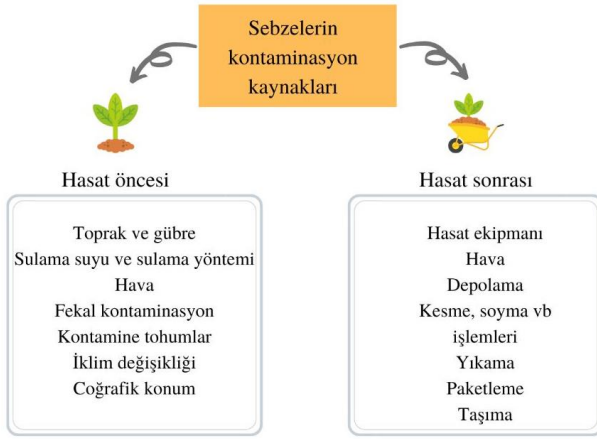
İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sebzelerin Çevresel Faktörler ile Kontaminasyonu

Taze meyve ve sebzeler çoğunlukla çiğ olarak veya minimum işleminden geçtikten sonra tüketildikleri için, olası bir patojen kontaminasyonu sağlık için risk oluşturmaktadır. Ürünün tarladan çatala olan sürecinde mikrobiyal kalitesini bozacak birçok faktör vardır ve bunların birçoğu potansiyel olarak ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. Yetiştirme sırasında patojen kontaminasyonunun gerçekleşmesi durumunda, ürünü dekontamine etmek zor olduğundan hasat öncesi üretimde karşılaşılabilecek tehlikeler önem taşımaktadır (Oluwaseun vd., 2020). Hasat öncesi tehlike kaynaklarını kontamine toprak, sulama suyu ve gübre oluşturmaktadır (Oluwaseun vd., 2020). Ürün kontaminasyonunun kaynağı ve yolu, üretim bölgesine göre değişmektedir. Her çiftliğin/tarlanın topografyası, iklim gibi çevresel risk faktörleri gibi farklılıklar bunun sebebinin oluşturmaktadır (Strawn vd., 2013; Ölmez, 2016) (Şekil 1). Kontamine toprak ve yer altı suları, ham (veya kötü işlenmiş) gübre ve kompost kullanımı, kontamine suya maruz kalma (sulama/su baskını), böcekler, çiftlik hayvanları, vahşi hayvanlar tarafından üretilen dışkı kontaminasyonu gibi faktörler ile patojenler sebzelere tarlada bulaşabilirler (Oluwaseun vd., 2020).

Enterik bakteriyel enfeksiyonlar tüm dünyada yayılmakla birlikte, zayıf çevresel ve kişisel hijyenin yaygın olduğu toplumlarda enfeksiyonlarla ilişkili çeşitli hastalıklara da neden olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerdeki ishal vakalarının %70'inin gıda kaynaklı olduğuna inanılmaktadır. Sebzeler yetiştirme dışında hasat, nakliye, ve sonraki işlemler sırasında da enterik patojenler ile kontamine olabilmektedir (Alemu vd., 2018). Sebzelerin kontaminasyon kaynakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Sebzelerin kontaminasyon kaynakları
(Ölmez, 2016)

2.1.1. Sulamanın Kontaminasyona Etkisi

Sulama, yetersiz yağış alan bölgelerde mahsul üretiminde önemli bir adımdır ve bu sebeple gıda üretimi için dünya çapında milyonlarca hektar sulanmaktadır. İyi kalitede sulama suyu kıtlaştıkça kirli suyla sulanan mahsüllerin tüketiminden kaynaklanan gıda kaynaklı hastalık salgını riski artmaktadır (Alam, 2014). Çiftçiler ürünleri için gerekli su ihtiyaçlarını genellikle yakın bölgedeki nehir, akarsu, gölet ve kuyulardan sağlamakta bu nedenle sulama için gerekli su standardı her zaman sağlanamamaktadır (Mcheik vd., 2018).

Sulama suyu kaynakları artan mikrobiyal kontaminasyon riskine göre yağmur suyu, derin kuyulardan gelen yer altı suyu, sığ kuyulardan gelen yer altı suyu, yüzey suyu ve ham/yetersiz arıtılmış su şeklinde sıralanabilir (Pachepsky vd., 2011). Sulama suyunun mikrobiyal kalitesi kritiktir. Çünkü hayvan ve insan atıklarıyla kirlenmiş su, hasat öncesi ve hasat sonrası patojenleri ürüne kontamine edebilmektedir (Mcheik vd., 2018).

Sebzelerin sulanmasında yağmurlama ve damlama olmak üzere yaygın olarak kullanılan iki sistem vardır. Sulama sistemi, ürünün kontamine olma derecesini önemli düzeyde etkilemektedir. Yağmurlamanın damlama sulamaya kıyasla ürün üzerinde daha yüksek kirlilik seviyesine yol açtığı yapılan çalışmalarda görülmektedir. Ancak sulama uygulamasının patojenlerin sebzelere geçişine etkisi detaylı olarak incelenmemiştir (Ganeshan ve Neetoo, 2015). Patojenlerin sulama suyu ile bitki yüzeyine tutunması suşa ve

bitkiye özgü farklılıklar göstermektedir (Pachepsky vd., 2011). Karıklarda ve damlatıcılarda sağlanan sulama suyuna *E. coli* ve *C. perfringens* inoküle edildiğinde kavun ve marul yüzeylerinde bu mikroorganizmaların tespit edildiği, ancak biberlerde geri kazanılmadığı ifade edilmiştir (Song vd., 2006).

Sulama suyunun taze sebzelere patojen geçişinde araç olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Brezilya’da yapılan bir çalışmada (Mcheik vd., 2018) nehir ve kuyu suyu ile sulanan ıspanak, maydanoz, lahana ve maruldan yüksek düzeyde koliform, *E.coli* ve *S. aureus* izole edildiği ve su örneklerindeki mikrobiyal yükün sebzelere kıyasla daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada (Al-Gamal vd., 2019) Nil Nehri’nden ayrılan ve yakınlardaki kanalizasyonlardan veya kentsel insan faaliyetlerinden atık su alan sulama suyu kanallarının kirlilik düzeyinin ve bu kirliliğin toprak ve marul, roka, salatalık gibi sebzelere mikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar sulardaki kirlilik ile sebzeler arasında pozitif bir korelasyon bulduklarını ve atık su, toprak ve sebzelerden *E. coli*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *S. aureus*, *Pseudomonas* sp. *Providencia* sp. izole etmişlerdir.

Fekal koliform ve fekal streptokoklar su kirliliğinin indikatörü olarak kullanılmalarına rağmen, bu bakterilerin tespit edilmemesi patojenlerin bulunmadığını doğrulamaz. Sebzelerin sulanmasında mikrobiyolojik kalite yönergelerine uygun, arıtılmış atık sular kullanılmalıdır (Balkhair, 2016).

2.1.2. Gübre Kullanımının Kontaminasyona Etkisi

Tarımsal sürdürülebilirlik için toprak kalitesini iyileştirmenin en etkili yolu, gübre ilavesiyle organik iyileştirme sağlamaktır. Toprağa gübre ilavesi, bitkisel ürünlerdeki potansiyel mineralizasyon ile mikrobiyal solunum, enzimatik aktiviteler, ve azot mineralizasyon oranlarının artışı sebebiyle tarımda uygun bir yönetim uygulaması olarak kabul edilmektedir (Faissal vd., 2017). Hayvansal, bitkisel ve biyosolid olmak üzere 3 temel kompost çeşidi vardır. Patojenlerin insanlara geçişinde potansiyel kaynak olabileceği endişesiyle yapılan çalışmalar genellikle hayvan kaynaklı kompostlar üzerine yoğunlaşmıştır (Bezanson vd., 2014). Sığır, koyun, domuz ve kümes hayvanları gibi çiftlik hayvanlarından elde edilen gübreler, bağırsak patojenlerinin sebzelere temasında araç

olabilmektedir (Bezanson vd., 2014).

2.2. *Clostridium* spp.

Clostridia sınıfı, *Clostridiaceae* familyasının üç parafiletik küme arasında dağılmış 13 cinsini ve tek bir cins tarafından temsil edilen dördüncü bir monofiletik grup olan *Clostridiales*'i içermektedir. *Clostridium* cinsi birçok türün diğer cinslere taşınmasıyla yeniden yapılandırılmıştır ancak filogenetik olarak heterojen kalmıştır (Prescott vd., 2016).

Clostridium cinsi 1880 yılında *C. butyricum* türüne göre önerilmiştir (Prazmowski, 1880). 2019 yılına kadar da yaklaşık 235 tür ve alt tür keşfedilmiştir (Figueiredo vd., 2020). Cins, Gram pozitif, sporlu, anaerobik bakteriler olarak tanımlanmakta ve psikrofiller, termofiller, asidofiller ve kinon ve sitokrom sentezleyiciler olarak geniş bir spektrumu içermektedir (Lawson, 2016). 16S rRNA geninin tam dizisinin ardından *Clostridium* cinsinde farklı gen ve protein dizilimine dayalı olarak büyük çeşitlilik tespit edilmiştir. Cinsin birçok türü filogenetik olarak *C. butyricum*'dan uzaklaşmıştır (Lawson, 2016). *Clostridium butyricum* ile ortak genleri paylaştıklarından *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* ve *Clostridium tetani*'nin açık bir şekilde *Clostridium* cinsine ait olduğu ifade edilmektedir (Prescott vd., 2016).

Birçok *Clostridium* türünün insanlarda enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. *C. botulinum* ve *C. tetani* nörotoksinojenik Clostridia olarak bilinmekte olup, *C. perfringens*, *C. sordellii* ve *C. septicum* gazlı kangren ve nekrotizan enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *C. difficile* ise enteropatojenik olarak bilinmektedir (Num and Useh, 2014).

Anaerobik spor oluşturan bakteriler, süt ürünleri, kırmızı et ve kanatlı etleri, taze ve konserve meyve ve sebzeler dahil olmak üzere pek çok gıdada tipik bir gaz ve koku oluşumu ile bozulmaya sebep olabilirler (EFSA, 2005). *Clostridium* spp. genellikle topraktan, insan ve hayvanların bağırsaklarından izole edilir (Walker, 1990). İyi Tarım Uygulamaları ve İyi Hijyen uygulamaları ile toprak ve hayvan dışkılarıyla kontaminasyon minimuma indirilebilir (EFSA, 2005). *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium difficile* sırasıyla nöroparalitik botulizm, toksikoenfeksiyon ve psödomembranöz kolit

hastalıklarından sorumlu olduklarından oldukça önemlidir (Bhunja, 2018). Özellikle *C. perfringens* ve *C. botulinum* gıdalardan sıklıkla izole edilmesi ile birlikte kontamine gıdaların tüketilmesi ile meydana gelen gıda zehirlenmeleri literatürde rapor edilmiştir (Güran ve Öksüztepe, 2013; Koluman vd., 2013; Kevenk vd., 2021).

2.3. *Clostridium (Clostridioides) difficile*

Clostridium difficile, ilk kez 1935 yılında sağlıklı bebeklerin bağırsak florasından izole edilmiş, o dönemde *Bacillus difficilis* olarak tanımlanmış zorunlu anaerob, spor oluşturan Gram (+) basil bir bakteridir. 1977 yılına kadar antibiyotik kullanımı ile ilişkili kolitin etmeni olarak insan enfeksiyonunun bir nedeni olarak tanınmamıştır (Curry, 2010). 1978'den beri psödomembranöz kolit etmeni olarak kabul edilmektedir (Delmée, 2001). Antibiyotik kullanımının başlamasıyla birlikte kalın bağırsak hastalıklarının patojenitesinde *C.difficile*'nin rolü artış göstermiştir (Czepiel vd., 2019).

Lawson ve Rainey (2015) tarafından *Clostridium* cinsinin *Clostridium butyricum* ve ilgili türlerle sınırlandırılmasına yönelik son önerisi, bu monofiletik grup dışında kalan *C. difficile* için karışıklığa yol açmaktadır (Lawson vd., 2016). Fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizlere dayanan yeni cins *Clostridioides* olarak önerilmiştir. 16S rRNA gen dizi analizine göre *Clostridium difficile*'nin en yakın akrabası %94,7 benzerlik değeriyle *Clostridium manganotii* de *Clostridioides manganotii* olarak bu cinse aktarılmıştır. Her ikisinin de filogenetik olarak *Clostridium* cinsinin tip türleri olan *C. butyricum* ile yakından ilişkili olmadığı ifade edilmektedir (Lawson vd., 2016). Bununla birlikte Oren ve Rupnik (2018) hem *Clostridium difficile* hem de *Clostridioides difficile* ifadelerinin prokaryotik kod hükümlerine uygun olduğunu ve ikisinin de kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

2.3.1. *C. difficile* ile İlişkili Hastalıklarda Risk Faktörleri

Antibiyotik kullanımı, ileri yaş (>65), hastane yatışı, zayıf immün sistem ve daha önce *C. difficile* enfeksiyonu geçirme (CDC, 2020) gibi ana faktörlerin yanında proton pompası inhibitörleri ve histamin reseptör-2 blokerları kullanımı (Samarkos vd., 2018) gibi faktörler *C. difficile* enfeksiyonları (CDE) için risk oluşturmaktadır. Spor oluşturan bir mikroorganizma olduğundan dolayı, *C. difficile*'nin tedavisi zordur ve enfeksiyonun tekrar

etmesi sık karşılaşılan bir durumdur. *C. difficile* ile ilişkili hastalıkların önceki antibiyotik kullanımı ile güçlü ilişkisi, bağırsak mikrobiyotasındaki bozuklukların enfeksiyonlarda merkezi bir rol olduğunun kabul edilmesine yol açmıştır (Samarkos vd., 2018). Hemen hemen tüm antibiyotikler *C. difficile* enfeksiyonuna karşı immün sistemin zayıflamasına neden olurken sefalosporinler, florokinolonlar, klindamisin ve bazı penisilinlerin riski önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir (Mullish ve Williams, 2018).

2.3.2. Virülans Faktörleri

C. difficile'nin başlıca virülans faktörlerinin toksin A ve B olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, organizma kolon içinde lokalizasyon için ve bağışıklığın ortadan kaldırılmasında önemli olabilecek başka virülans faktörlerinin de olduğu belirtilmektedir. Bazı *C. difficile* türlerinin diğerlerine göre daha yaygın olarak enfeksiyona sebep olduğu, ve bu durumun toksin A ve toksin B üretiminden bağımsız olduğu bilinmektedir (Poxton vd., 2001).

Toksin

C. difficile'nin ana virülans faktörleri patojenite lokusu veya PaLoc olarak bilinen bir bölge içinde yer alan sırasıyla toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB)'dir. tcdR, toksin gen ekspresyonunu doğrudan aktive eden alternatif bir RNA polimeraz sigma faktörünü kodladığı, tcdE geninin yüksek oranda toksin sentezleyen suşlarda, toksinin hücre dışı salınımına dahil olduğu varsayılan bir holini kodladığı belirtilmektedir. Bir diğer gen olan tcdC tarafından kodlanan proteinin rolü henüz anlaşılamamıştır (Janoir, 2016).

Uzun yıllar boyunca toksin A'nın *C. difficile*'nin başlıca virülans faktörü olduğu varsayılmasına rağmen, yapılan bir çalışmada (Awad vd., 2014) önceden bağırsak hasarı mevcut olmadığı veya TcdA'nın ölümcül konsantrasyonları uygulanmadığı sürece, tek başına TcdB uygulamasının hamsterlarda semptomlara neden olmadığı, TcdA'nın TcdB'nin aktivitesini güçlendirebildiği, toksinlerin sinerjik olarak hareket edebileceği belirtilmiştir. Ayrıca konakçı üzerinde TcdA'nın önce bağırsak epitelinde hasara neden olduktan sonra TcdB üretimi ile enfeksiyon oluşumunda etkili olabileceği ifade edilmiştir.

TcdA ve TcdB'nin yanı sıra, *C. difficile* suşlarının %6-30'u bir *C. difficile* transferaz CDT olarak adlandırılan üçüncü toksini sentezlemektedir (Aktories vd., 2018). Bu toksin, TcdA ve TcdB'nin toksisitesini güçlendirebilmekte ve hastalığın daha ağır seyretmesine sebep olabilmektedir. Bu nedenle ek bir virülans faktörü olarak düşünülmektedir (Denève vd., 2009).

Endospor

Bakteriyel endosporların *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerinin türleri tarafından ve aynı zamanda Firmicutes filumu içindeki birçok grup tarafından oluşturulduğu iyi bilinmektedir. Fiziksel ve kimyasal uygulamalara karşı direnç gösteren sporların bilinen en dirençli hücresel yapı olduğu düşünülmektedir (Pereira vd., 2013).

C. difficile enfeksiyonu öncelikli olarak toksinler ile ilişkilendirilse de endosporlar en önemli virülans faktörlerinden birini oluşturmaktadır ve patojenin varlığını sürdürmesinden ve enfeksiyonun tekrar etmesinden sorumlu tutulmaktadır (Collery vd., 2013; Zhu vd., 2018). Sağlıklı mikrobiyotanın bozulmasını takiben, bağırsak *C. difficile* kolonizasyonuna açık hale gelmektedir. Daha sonra bağırsakta sporlanma meydana gelebilmekte ve bu da *C. difficile*'nin uzun süreler boyunca varlığını sürdürmesine sebep olmaktadır (Awad vd., 2014). Konakçının gastrointestinal sistemindeki sporların gelişip toksin üretmesi ise vejetatif forma geçmesi gerekmektedir. Uygun koşullar altında germinantların germinant reseptörü tarafından algılandığı ve spor çimlenmesinin başladığı düşünülmektedir (Sorg ve Sonenshein, 2008).

C. difficile'nin spor jermantasyonu ve büyüme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır fakat sporlu ve Gram (+) bakteri olan *B. subtilis*'te görülen (1) jermine olan sporların reseptörlere bağlanması, (2) tek değerlikli katyonların salınması ve (3) spor peptidoglikan korteksinin enzimlerle hidrolizi, çekirdek rehidrasyonu ve metabolik aktivitenin ve replikasyonun başlatılması gibi üç aşamadan oluşan süreci izlediği düşünülmektedir (Moore vd., 2013).

Tutunma (Adherans) Faktörleri

Patogenizin ilk adımı olan kolonizasyon süreci, bir dizi adhezyon faktörünü içermektedir (Denève vd., 2008). Yüzey tabakası (S-layer), hücre duvarı proteinleri (Cell Wall proteins, CWP), fibronektin bağlayıcı proteinler, flagella, fimbria, ısı şoku proteini GroEL *C. difficile*'nin adhezyon faktörleri arasında gösterilebilir (Awad vd., 2014).

Hücre duvarı proteinleri

Cwp 84, tüm *C. difficile* suşlarında mevcuttur ve daha güçlü adhezyon, daha kalın biyofilm, planktonik büyüme defekti ve *in vitro* virülans üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tijerina-Rodríguez vd., 2019).

S tabakası

C. difficile'nin baskın dış yüzey bileşeni olan S tabakası (Spigaglia vd., 2013), çoğu bakteride tek bir protein türünden oluşmasına karşın, *C. difficile*'de bu katman yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW) olarak adlandırılan iki protein alt biriminden oluşmaktadır (Awad vd., 2014). S tabakası patogenez için kritik olan patojen-konak etkileşimlerinde rol oynamaktadır. S tabakası proteinlerinin hücre hatlarına *C. difficile* tutunmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Spigaglia vd., 2013).

Flagella

Gastrointestinal patojenlerin çoğu için, flagella ve flagellum kaynaklı hareketlilik, patojenin kolonizasyon bölgesine doğru hareket etme kabiliyetini artıran temel virülans faktörü olarak kabul edilmektedir (Baban vd., 2013). Bir kamçı geleneksel olarak bir hareketlilik organeli olarak kabul edilse de başka biyolojik işlevlerinin olduğu, bakteriyel yaşam döngüsünde biyofilm oluşumu, protein taşınımı, adhezyon gibi işlevlere katkı sağlayabilmektedir (Haiko ve Westerlund-Wikström, 2013). *C. difficile*, enfeksiyon sırasında bağırsak hücrelerine tutunmaya katkıda bulunan flagella üretmektedir. Flagellum ve toksin gen ekspresyonu, flagellar alternatif sigma faktörü sigD ile ilişkilidir (Anjuwon-Foster vd., 2018). Flagellanın *C. difficile* patogenezindeki rolü karmaşık olmakla birlikte, flagellanın bağırsakta bulunan besinlere karşı hareketlilik sağlamaktan ziyade toksin ekspresyonunun modülasyonu yolu ile virülans üzerinde doğrudan rol oynadığı düşünülmektedir (Stevenson vd., 2015).

C. difficile enfeksiyonlarında virülans faktörleri ve etki mekanizmaları ile meydana getirdiği riskler Tablo 1’de gösterilmiştir (Tijerina-Rodriguez vd., 2019).

Tablo 1

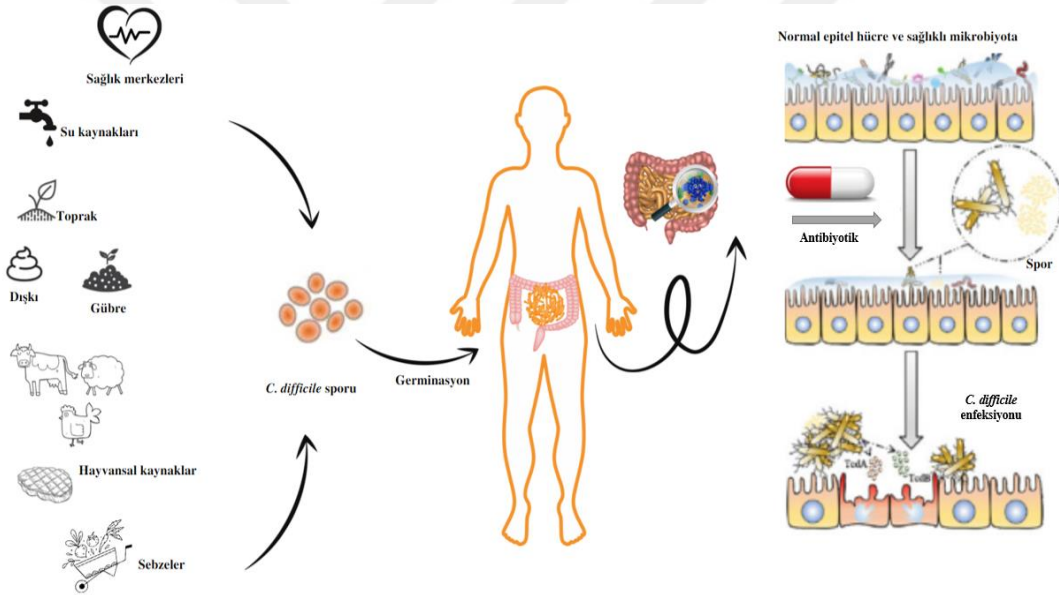
C. difficile enfeksiyonlarında virülans faktörleri

Faktör	Mekanizma/etki	Risk
tcdC ve binary toksin	-Hipervirulent suşlarda toksin A ve B’nin yüksek seviyelerde sentezi	<i>In vivo/in vitro</i> koşullarda artan patojenite
agrI lokusu	-tcdC’den bağımsız olarak toksin A ve toksin B sentezinin regülasyonu	Artan kolonizasyon ile ilişkili virülans regülasyonu
Biyofilm	-Çok türlü bakteriyel popülasyonlarda <i>C. difficile</i> ’nin hayatta kalma alanı -Varyant suşlarda QS ile düzenlenen toksin ve biyokütle birikimi -Sporları birikimi	<i>C. difficile</i> ’nin uzun süre kalıcılığını koruması
S-layer protein A (SlpA)	Hipervirulent suşlarda dizi değişkenliği olan alt birimler	Bağırsak mukozasında artan adhezyon
Cell wall protein 84 (Cwp84)	-Hücre dışı matris proteinlerinin (fibronektin, laminin, vitronektin) bozulması -Yüksek proteolitik aktiviteye sahip suşlarda daha kalın biyofilm üretimi	- <i>C. difficile</i> ’nin konakçıda serbest bırakılması ve yayılması -Adhezyon ve kolonizasyonda artış
Flagella	Flagellin ve flagellar proteinlerde transkripsiyon sonrası modifikasyonların meydana gelmesi	Kolonizasyon ile ilişkili biyofilm ve adhezyon artışı
Spor	-Sporların dış yüzey tabakasının yapısal özelliklerinin geliştirilmesi -Spor üretimi ve biyofilm oluşumu	Antibiyotik tedavisine rağmen konakta CDE bulaşması ve <i>C. difficile</i> ’nin varlığını koruması

(Tijerina-Rodriguez vd., 2019)

2.3.3. Patojenite

C. difficile patolojisinde ilk koşul, normal bağırsak florasının bozulmasıdır. Sağlıklı bir bağırsak florası *C. difficile* enfeksiyonuna karşı koruyucu bariyer görevi üstlenirken, bu bariyer bozulduğunda konakçı, enfeksiyona açık hale gelmektedir. Böyle bir hasara neden olabilecek ana faktör antibiyotik kullanımımızdır (Delmée, 2001). Patojenitenin ilk adımı kolonizasyondur. *C. difficile* sporları tarafından endojen veya eksojen kontaminasyondan sonra sporlar vejetatif forma geçmekte ve çoğalmaktadır. *C. difficile* daha sonra mukus tabakasına yapışabilmekte ve flagella ve proteazları yardımıyla mukus tabakasına nüfuz edebilmektedir. Bu adımdan sonra *C. difficile* sahip olduğu çoklu adhezinler ile enterositlere yapışabilmektedir (Denève vd., 2009). *C. difficile*'nin bulaşma kaynakları ve bağırsağa kolonizasyonu Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *C. difficile*'nin bulaşma kaynakları ve bağırsağa kolonizasyonu (Yang ve Yang, 2019)

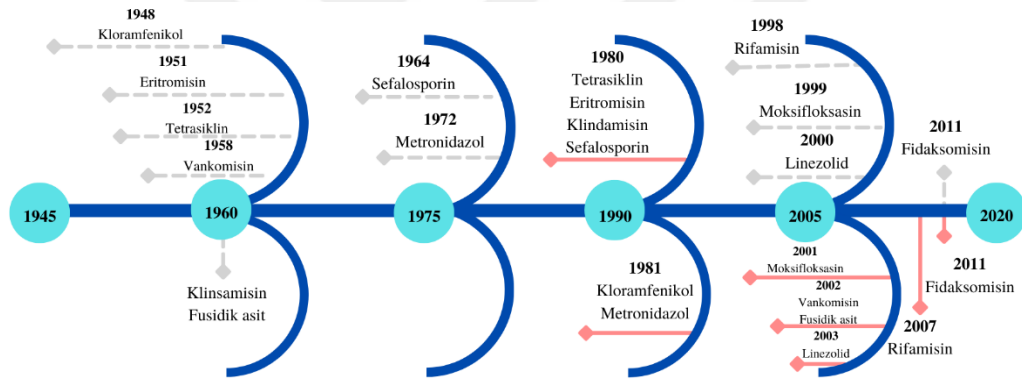
2.3.4. *C. difficile*'nin Antibiyotik Direnci

Bakterilerde antibiyotik direnci, türler arasında dikey olarak aktarılan doğuştan gelen genetik ve fizyolojinin yanısıra bakterilerin türler ve cinsler arasında yatay olarak genetik materyal alışverişi yapma eğiliminin ürünü olarak belirtilmektedir (Wright ve Sutherland, 2007).

C. difficile ile ilişkili hastalıklarda olağan tedavinin antibiyotik kullanılması olması

yanında, antibiyotik maruziyeti risk faktörlerinden biridir (Roshan vd., 2017). Antibiyotik direnci *C. difficile* ile ilişkili hastalıkların yayılmasında önemli rol oynamaktadır (Banawas, 2018). Antibiyotik direnç oranları coğrafi bölgelere ve yerel/ulusal antibiyotik politikasına bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterse de, veriler klinik *C. difficile* izolatlarının çoğunun sefalosporinler, florokinolon, eritromisin ve klindamisine dirençli olduğunu göstermektedir (Spigaglia vd., 2018). *C. difficile* tedavisinde antibiyotiklerin kullanılmaya başlandığı ve dirençlerinin rapor edildiği zaman çizelgesi Şekil 3’de verilmiştir.

C. difficile’deki antibiyotik direnci çok faktörlü bir yapıya sahip olup, metabolik yollardaki varyasyonlar ve biyofilm üretimi gibi faktörlerin yanı sıra, genetik elementlerin kazanılması ve antibiyotik hedef bölgesindeki değişiklikler, antibiyotik varlığında *C. difficile*’nin hayatta kalmasına katkı sağlar (Spigaglia vd., 2018).



Şekil 3. *C. difficile* tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin zaman çizelgesi (Harnvoravongchai vd., 2017)

Gri ve kesikli çizgiler antibiyotiklerin piyasaya sürülme tarihini, kırmızı ve düz çizgiler kazanılan direncin rapor edildiği tarihi göstermektedir.

Tedavide kullanılan bazı antibiyotiklerin etki ve varsayılan direnç mekanizmaları Tablo 2’de özetlenmiştir. Orta ve şiddetli *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarda ilk seçeneklerden biri olan vankomisin, hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikan sentezini inhibe etmekte ve gastrointestinal sistem tarafından zayıf bir şekilde emilmektedir. *C. difficile*’deki direnç mekanizması ise halen net değildir (Spigaglia vd., 2018). Tedavide kullanılan bir diğer antibiyotik olan metronidazolün ise vankomisine kıyasla etkinliğinin azalmasının nedenleri de tam olarak belirlenememiştir. Metronidazolün etki

mekanizmasının da tam olarak aydınlatılamamasının yanında DNA sentezi inhibisyonu, oksidasyon yoluyla DNA hasarı, DNA bozulmasına ve hücrenin ölümüne sebep olan tek ve çift zincirli bağların kopması ile etki oluşturduğu düşünülmektedir (Löfmark vd., 2010). Eritromisin, 50S ribozomal alt birime bağlanarak, bakterilerde protein sentezini engelleyen ve ribozomun mRNA boyunca hareketini engelleyerek uzama döngüsünü bozan bir antibiyotiktir. CDE ile ilişkisi güçlü değildir. Ancak sıklıkla diğer antibiyotikler ile birlikte kullanıldığından riski değerlendirmek zordur (Baines ve Wilcox, 2015).

Tablo 2

C. difficile tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etki mekanizması

Antibiyotik	Etki mekanizması	Varsayılan direnç mekanizması	Referans
Metronidazol	Bakteriyel DNA'nın kırılması ve DNA sarmalının kararsızlaşması	İz yollarında farklılaşma, biyofilm oluşumu	(Peng vd., 2017)
Vankomisin	Peptidoglikanın öncü UDP-N-asetilmuramil pentapeptininin D-Ala-D-Ala alt birimi	Peptidoglikan biyosentezi için gerekli proteinlerdeki mutasyonlar, biyofilm oluşumu	
Fidomiksin	RNA polimeraz	<i>rpoB</i> mutasyon	
Rifamisin	DNA'ya bağımlı RNA polimerazın alt birimi Ramoplanin	<i>rpoB</i> mutasyon	
Fusidik asit	Ribozom üzerinde uzama faktörü G'yi bağlayarak protein sentezini inhibe etmek	<i>fusA</i> mutasyon	
Florokinolonlar	DNA giraz ve topoizomeraz IV'e bağlanarak DNA sentezinin inhibisyonu	<i>gyrA</i> ve <i>gyrB</i> mutasyon	(Isidro vd., 2017)

2.4. *C. difficile*'nin Çevresel Kaynaklardaki Varlığı

Toplumda artan sayıda *C. difficile* enfeksiyonu, etkenin başka enfeksiyon kaynaklarının araştırılmasına sebep olmuştur. *C. difficile*'nin ana doğal rezervuarı, insan ve hayvanların bağırsaklarıdır. Ancak *C. difficile*, spor oluşturma yeteneği ile her yerde bulunma potansiyeline sahiptir (Janezic vd., 2016).

Al- Saif ve Brazier (1996) tarafından Galler'de yapılan bir çalışmada nehir sularında %87,5, deniz suyunda %44, göl suyunda %46,7, yüzme havuzu sularında %50, musluk sularında %5,5 ve toprak örneklerinde %21 oranında *C. difficile* tespit edilmiştir.

2007 yılında Finlandiya'daki içme suyu dağıtım sistemi, toplumda büyük bir gastroenterit salgınına neden olan arıtılmış atık su ile kontamine olmuştur. Yapılan araştırmada (Kotila vd., 2013) su örneklerinden musluk suyundan 5 ve arıtılmış kanalizasyon atığından 7 olmak üzere 12 toksin pozitif *C. difficile* izolatı elde edilmiş ve musluk suyu dağıtım sisteminde *C. difficile* kontaminasyonu ve toksinojenik *C. difficile*'nin sular aracılığı ile bulaşmasının mümkün olduğunu ifade edilmiştir.

İran'da atık su arıtma tesisinde *C. difficile* varlığını belirlemek için yapılan bir çalışmada (Nikaeen vd., 2015), aktif çamur arıtma tesisinden ve atık stabilizasyon havuzundan 95 numune alınmıştır. Çürütülmüş çamur örneklerinin %13,6'sında, atık stabilizasyon havuzundan alınan örneklerin %5'inde *C. difficile* tespit edilmiştir. Nehir, deniz, göl, iç drenaj, yüzme havuzları, atık su arıtma tesisleri ve musluk suyu gibi farklı su kaynaklarında *C. difficile* varlığı saptanmıştır (Janezic vd., 2016).

Atık su arıtma tesisi ve göl tortusunda *C. difficile* varlığı araştırılan çalışmada (Numberger vd., 2019), atık sudan iki toksinojenik olmayan izolat ve tortu örneğinden bir toksinojenik izolat elde edilmiştir. Tüm izolatların insan kaynaklı izolatlar ile yakın genomik ilişki gösterdiği belirtilmiştir.

Kırsal bir toplulukta hayvanların dışkısında, toprakta ve içme suyunda *C. difficile* prevalansının araştırıldığı bir çalışmada toprak örneklerinden %37, tavuk dışkısı örneklerinden %17,4 ve içme suyu örneklerinden %6 oranında *C. difficile* izole edilmiştir.

Dışkı, toprak ve su izolatlarının sırasıyla %55, 66,7 ve 14,3 oranında toksinojenik olduğu saptanmıştır (Simango, 2006).

Japonya'da domuz dışkılarından elde edilen gübrelerde %36 oranında *C. difficile* prevelansı saptanmış olup, elde edilen izolatların %82'sinin toksinojenik olduğu belirtilmiştir (Usui vd., 2017).

Avustralya'da çim alanlardan alınan çim ve kök kısmıyla birlikte topraktan alınan örneklerde %59 oranında *C. difficile* varlığı tespit edilmiş ve 014/020 toksinojenik ribotipin %39 oranında baskın olduğu ifade edilmiştir (Moono vd., 2017).

C. difficile, tarımsal amaçlarla kompostlanan hayvan gübresi ve insan biyoatıklarında bulunabildiğinden, kompost ürünler *C. difficile* için kaynak oluşturabilmektedir (Lim vd., 2020). Kompost ürünlerdeki *C. difficile* ile insan, kök sebze ve çevreden daha önce izole edilen suşlar ile genetik ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada (Lim vd., 2020), kompostlanmış ürünlerin %22,5'inde *C. difficile* varlığı saptanmıştır. Avustralya'da yapılan bu çalışmada (Lim vd., 2020) ribotip 056'nın yüksek çözünürlüklü genom analizi, insan, sebze, kompost ürün ve çevreden alınan izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi ortaya çıkarmıştır.

Hayvan gübresi bazlı kompostlar, toksinojenik *C. difficile* suşlarının tarımsal ortama yayılmasında önemli rol oynayabilmektedir (Dharmasena ve Jiang, 2018). Yapılan bir çalışmada kompost/gübre örneklerinden %36 oranında *C. difficile* izole edilmiştir. Elde edilen izolatların %63,8'inin toksin A, %67,2'sinin toksin B genine sahip olduğu ve en baskın ribotiplerin 106, 020 ve 412 olduğu belirtilmiştir (Dharmasena ve Jiang, 2018). Nijerya'da yapılan bir çalışmada ise toprak, su, sebze ve hayvan dışkısından alınan örneklerde *C. difficile* tespit edilmemiştir (Adegboyega, 2014).

Diğer bir çalışmada ise hastanelerin dış ortamlarından toprak, malç, çim ve kumdan oluşan 159 numunenin %60,4'ünden *C. difficile* izole edilmiştir. İzolatların en yüksek oranının 014/200 ve 010 ribotiplerine ait olduğunu belirtilmiştir (Perumalsamy vd., 2019). Başka bir çalışmada veterinerlik hastanesi ortamından alınan örneklerin %17'sinde *C. difficile* varlığı saptandığı ve elde edilen 078, 014, 039, ve 154 ribotiplerinden 078 ve 014'ün sıklıkla insan patojeni olarak bulunduğu ifade edilmiştir (Villagómez-Estrada vd., 2019).

2.5. *C. difficile*'nin Hayvanlardaki Varlığı

Hayvanlar, insan patojenik mikroorganizmalarının önemli bir kaynağı olup, doğrudan veya dolaylı bir temasın ardından, çevresel bir kontaminasyonun ve/veya gıda olarak tüketildiklerinde hastalıkların yayılmasında araç olabilmektedirler (Steinmuller vd., 2006). Gıda olarak tüketilen hayvanlarda *C. difficile* varlığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Çiftlik hayvanları potansiyel bir *C. difficile* kaynağını oluşturuyorsa, kolonize olmuş veya enfekte olmuş hayvanların dışkılarıyla kontamine olmuş gıdaların da besin zinciri yoluyla hayvanlardan insanlara bulaşma yollarından biri olabileceği ifade edilmiştir (Candel-Pérez vd., 2019). Ayrıca kedi ve köpekler de *C. difficile* varlığı rapor edilmiştir. Ancak yapılan moleküler karakterizasyon ve epidemiyolojik analizler kediler ve köpeklerle ilişkili *C. difficile* enfeksiyon riskinin düşük olduğunu ancak dışlanamayacağını ortaya koymuştur (Rabold vd., 2018).

2.6. *C. difficile*'nin Gıdalardaki Varlığı

Gıdalar aracılığı ile meydana gelen *C. difficile* enfeksiyonu rapor edilmese de, *C. difficile* patolojisi ve epidemiyolojisi, rezervuarları, sporların direnci ve dağılımı ve gıdalardan izolasyonu değerlendirildiğinde kontamine gıda tüketiminin *C. difficile* ile ilişkili hastalıklara neden olma olasılığı vardır (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013). *C. difficile* izolatlarındaki genetik çeşitlilik, *C. difficile*'nin hastane dışındaki kaynaklardan izolasyonu, elde edilen izolatların insanlardan izole edilenler ile benzer suşlar olması, toplumda edinilmiş *C. difficile* kaynaklı enfeksiyona sahip hastaların çoğunluğunda geleneksel risk faktörlerinin (ileri yaş, antibiyotik kullanımı, hastanede yatış vb.) yokluğu göz önüne alındığında, toplumda *C. difficile*'nin gıda kaynaklı ve zoonotik yayılması ile ilgili endişeler artmaktadır (Gupta ve Khanna, 2014). Gıda zincirinde kontaminasyona neden olabilecek bulaşma kaynakları arasında; çiftlik ortamı, çiftlik hayvanları, toprak, gübre, su, meyve-sebze, çiğ ve işlenmiş gıdalar, yüzeyler ve gıda çalışanları ve işleme tesisleri gösterilmektedir (Candel-Pérez vd., 2019). Son ürünlerde sporların varlığı, kontamine hammadde, gıda endüstrisinde çapraz kontaminasyon ve gıda işleme sırasında spor üretimi ile açıklanabilmektedir (Candel-Pérez vd., 2019).

İnsan beslenmesinde *C. difficile*'nin küresel ve tarihsel dağılımının incelendiği bir çalışmada (Rodriguez-Palacios vd., 2020) epidemiyolojik verilerin aksine tropik bölgelere gidildikçe gıdalarda *C. difficile* varlığının artma eğiliminde olduğu ve bu durumun tropik bölgelerdeki zengin mikrobiyomun *C. difficile* enfeksiyonuna karşı koruyucu olabileceği hipotezine dayandırılabilirliği belirtilmiştir. Araştırmada aynı zamanda *C. difficile* riski yüksek olan gıdalar arasında deniz ürünleri, yeşil yaprakları sebzeler, domuz eti ve tavuk etinin olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde gıdalarda *C. difficile* varlığı et ürünlerinde bildirilmiştir. Kuşbaşı et ve dana kıymada sırasıyla %2 ve %4 (Atasoy ve Gücükoğlu, 2017) ve tavuk etinde %25 (Güran ve İlhak, 2015) *C. difficile* varlığı saptanmıştır. Hampikyan vd., (2018) sığır karkaslarından %33,6, koyun karkaslarından %25,3 *C. difficile* izole etmişler ve sığır izolatlarının %18,1, koyun izolatlarının %7,7'sini ribotip 027 olarak tanımlanmışlardır. İzolatların amoksilin-klavulanik asit, vankomisin ve tetrasikline duyarlı, sefotaksim ve imipeneme dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bingol vd., (2020) tavuk karkaslarında %37,3 oranında *C. difficile* tespit etmişler ve izolatların %8,7'sini ribotip 027 olarak tanımlanmışlardır. Tüm izolatların amoksilin-klavulonik asit, vankomisin, metronidazol ve tetrasikline duyarlı, sefotaksim ve imipeneme dirençli olduğunu ifade etmişlerdir.

2.6.1. *C. difficile*'nin Sebzelerdeki Varlığı

Gıdalarda *C. difficile* varlığı çoğunlukla et ürünlerinde araştırılmıştır. Su (Kotila vd., 2013; Numberger vd., 2019), toprak (Perumalsamy vd., 2019) ve gübrelerde (Dharmasena ve Jiang, 2018) *C. difficile* varlığı belirtilmiştir. Kompostlanmış gübrenin toprağa uygulanması, *C. difficile*'nin gıda zincirine geçmesi için risk oluşturmaktadır. Kontamine sular ile sulama veya yıkama sonucunda sebzelerin kontaminasyonu meydana gelebilir (Candel-Pérez vd., 2019). Yapılan çalışmalarda su ve gübre gibi kaynaklardan *C. difficile* izole edilmesi bu kaynaklar ile temas eden sebzelerin de kontamine olabileceğini düşündürmektedir. *C. difficile*'nin sebzelere bulaşma kaynakları Şekil 4'de ve sebzelerde *C. difficile* varlığı Tablo 3'de gösterilmiştir.

Bakri vd., (2009) İskoçya'da yaptıkları bir çalışmada tüketime hazır salatalarda %7,3 oranında *C. difficile* bulduklarını ve elde ettikleri izolatların vankomisin ve metronidazole

duyarlıyken, sefotaksim, eritromisin, moksifloksasin ve klindamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Metcalf vd., (2010) içeriği havuç, patates, sarımsak, zencefil, pancar, mantar, marul, yeşil soğan, turp, brokoli, kereviz kökleri, pancar, kuşkonmaz ve arpacık soğanından oluşan salatalardan %4,5 oranında *C. difficile* izole etmişlerdir. Elde ettikleri 3 izolatın ribotip 078/NAP 7/toksino tip V'e ait olduğunu, diğer iki izolatın daha önce Kanada'da *C. difficile* enfeksiyonuna sahip hastalardan elde edilen izolatlar ile aynı suşlar olduğunu belirtmişlerdir. Zencefil ve havuçtan elde edilen bu izolatlar metronidazol ve vankomisine duyarlı, klindamisine ise dirençli bulunmuştur.

Fransa'da yapılan başka bir çalışmada ise (Eckert vd., 2013) içeriği havuç, mantar, turp, brokoli, kereviz sapı, kırmızı lahana, karnabahar, soya fasülyesi, bezelye filizi ve pancardan oluşan tüketime hazır salatalarda %2,9 oranında *C. difficile* saptanmıştır.

Tablo 3

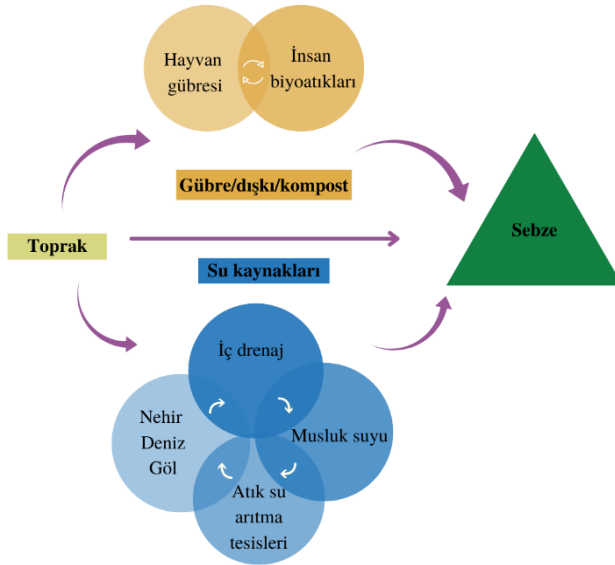
Sebzelerde *C. difficile* bulunma sıklığı

Sebze	Ülke	Bulunma sıklığı (%)	Ribotip	Referans
Salata (ıspanak, marul)	İskoçya	3/40 (7,5)	017,001	Bakri vd., (2009)
Salata	Kanada	5/111 (4,5)	078	Metcalf vd., (2010)
Salata	Fransa	3/104 (2,9)	001, 014/020/077, 015	Eckert vd., (2013)
Patates, soğan, pancar	Avustralya	30/100 (30)	QX 274, 051	Lim vd., (2018)
Marul	ABD	41/297 (13,8)	027	Han vd., (2018)
Patates, yeşil sebze	Slovenya	28/154 (18,2)	014,020	Tkalec vd., (2019)

Avustralya'da yapılan bir çalışmada (Lim vd., 2018) organik patateslerin %55,6'sında, organik olmayan patateslerin %50'sinde, organik pancarların %22,2'sinde, organik soğanların %5,6'sında ve organik havuçların %5,3'ünde *C. difficile* saptanmıştır. Araştırmacılar izolatların %51,2'sinin toksinojenik olduğunu ve ribotiplerin çoğunun Avustralya'da insan ve hayvanlardan yaygın şekilde izole edilen ribotipler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca organik ve organik olmayan patateslerde *C. difficile* varlığı açısından istatistiksel bir farklılık saptamadıklarını ancak patateslerin diğer sebzelere göre daha yüksek *C. difficile* yüküne sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Marullarda *C. difficile* varlığını araştıran bir çalışmada (Han vd., 2018) %13,8 oranında *C. difficile* saptanmış ve izolatların %82,9'unun toksin B, %17,1'inin hem toksin A hem de toksin B üreten suşlar olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca elde ettikleri izolatların metronidazol, vankomisin ve eritromisine dirençli olduğunu ifade etmişlerdir.

Tkalec vd., (2019)'nin Slovenya'da yaptıkları çalışmada 154 sebze örneğinin %18,2'sinde *C. difficile* tespit edilmiştir. Araştırmacılar PCR ile belirledikleri 25 farklı ribotipteki 115 izolatın 10 tanesinde toksikojenik gene rastlamışlardır. Bu ribotiplerin çoğunluğunun Slovenya'da insanlar, hayvanlar, toprak veya suda daha önceden saptandığını bildirmişlerdir. Test ettikleri sebzeler arasında patateslerin %28 ile en yüksek oranda tespit edilen sebze olduğunu ve pozitif sonuç veren patates örneklerinin %66,7'sinin üç farklı kıtadaki 12 farklı ülkeden ithal edildiğini ifade etmişlerdir. Dünyanın farklı bölgelerinde yetişen sebzeler üzerine yapılan bu çalışma; *C. difficile*'nin gıdalarda varlığının küresel çapta bir sorun olabilme potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4. *C. difficile*'nin sebzelere bulaşma kaynakları

Usui vd., (2020) ise aralarında zencefil, soğan, ginseng, taze soğan, turp ve yerel sebzeler olan kök sebzelerde %4,7 oranında *C. difficile* saptamışlardır. Yapraklı sebzelerden ise izolat elde etmemişlerdir.

Almanya'da yapılan bir çalışmada ise (Scholtzek vd., 2022) patateslerin %26,7'sinde ve salataların %1,9'unda *C. difficile* saptanmış ve elde ettikleri izolatların klinik izolatlarla

benzer PCR ribotiplerine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

2.7. Doğal Maddelerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Clostridium difficile ile ilişkili hastalıklarda tedavide kullanılan antibiyotiklere direncin artması ve enfeksiyonların tekrarlaması, bitki kaynaklı ilaçlar da dahil olmak üzere alternatif terapötik yaklaşımların geliştirilerek direncin kontrol altına alınma ihtiyacını oluşturmaktadır (Aljarallah, 2017). Aynı zamanda mikroorganizmaların kontrolünde kullanılan sentetik kimyasalların karsinojenik etkileri, akut toksisiteleri ve çevresel kirlenme sebebiyle kullanımları sınırlıdır (Swamy vd., 2016). *C. difficile* inhibisyonunda doğal maddelerin kullanımına ilişkin yapılan çalışmalar mevcuttur.

Shahverdi vd., (2007) 20 µg/mL trans-sinamaldehit varlığının klindamisin dirençli *C. difficile* için MİK değerini 4,0'dan 0,25 µg/mL'ye 16 kat düşürdüğünü ve bu sonuçların trans-sinamaldehitin düşük konsantrasyonlarının, klindamisinin antimikrobiyal etkisini artırdığını ve doğal ürünlerin *C.difficile*'ye karşı kombinasyon tedavisi için kullanılmasının klinik fayda sağladığını ifade etmişlerdir.

Başka bir çalışmada (Shilling vd., 2013) Hindistan cevizi yağının *C. difficile*'ye karşı inhibe edici özelliği olmadığı fakat Hindistan cevizinden türetilen laurik asit (C₁₂), kaprik asit (C₁₀) ve kaprilik asit (C₈) gibi orta zincirli yağ asitlerinin inhibe edici özellikte olduğu belirtilmiştir.

C. difficile ATCC 9689, *C. difficile* PCR ribotip 027 ve *C. difficile* PCR ribotip 106 üzerine manuka balının (%5, v/v) antibakteriyel aktivitesi agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiş ve 7 günlük inkübasyon sonunda inhibisyon zonu 14,5-14,7 mm arasında saptanmıştır. İnhibisyon zonununun 48 saatten sonra değişmediğini ve MİK değerinin her 3 suş için de %6,25 (v,v) bulduklarını belirtmişlerdir (Hammond ve Donkor, 2013).

Nar ekstraktının *C. difficile* kolonizasyonunda önleyici etkisinin olabileceği belirtilen bir çalışmada (Finegold vd., 2014), klinik izolatlara karşı nar ekstraktının MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile saptanmış olup, 12,5-25 mg/mL arasında belirlenmiştir.

Justin ve Antony (2016) hastalardan izole ettikleri *C. difficile* izolatlarına karşı karanfil, zencefil ve muskat yağlarının antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Tüm *C. difficile* izolatlarının karanfil yağına duyarlı olduğunu, toksinojenik izolatlarının tamamının, toksinojenik olmayan izolatların %93,33'ünün muskat yağına ve toksinojenik izolatların %85'inin, toksinojenik olmayanların %80'inin zencefil yağına karşı duyarlılık gösterdiğini ifade etmişlerdir. Karanfil yağının MİK değerlerinin 1,25-2,5 µL/mL, muskat ve zencefil yağının ise 2,5-10 µL/mL arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Rhodomyrtus tomentosa bitkisinden elde edilen rhodomyrtone maddesinin *C. difficile* vejetatif hücrelerine karşı MİK değerlerinin 0,625-2,5 mg/L arasında olduğu belirtilmiştir (Srisuwan vd., 2018).

Kekik, sarımsak ve karabiber esansiyel yağlarının *C. difficile* klinik izolatları üzerinde anti-clostridial etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise (Aleksić vd., 2022) en güçlü bakterisidal aktivitenin kekik esansiyel yağında gözlendiği ve MİK değerinin 0,02-1,25 mg/mL arasında değiştiği ifade edilmiştir. Aynı zamanda sarımsak esansiyel yağının MİK değerinin 0,02-40mg/mL ve karabiber esansiyel yağının MİK değerinin 0,04-40 mg/mL arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir.

2.8. Yıkamanın Sebzelerin Mikrobiyal Kalitesine Etkisi

Taze meyve ve sebzeler, gıda kaynaklı hastalıkların nedeni olan patojen mikroorganizmaların bilinen taşıyıcılarıdır. Taze ürünlerin işlenmesinden sonra mikrobiyolojik yükü gidermek için yıkama işlemi ve bu işlemde kullanılacak dezenfektanlar gereklidir. Bu dezenfektanların iyi birer antimikrobiyal madde olmalarının yanında, insan ve çevre sağlığına zararsız, uygun fiyatta olmaları ve uygulandıkları üründe istenmeyen duyuşal değişikliklere sebep olmamalıdır (Joshi vd., 2013).

Günümüzde taze ürünlerde raf ömrünü ve güvenliği artırmak için klor içeren dezenfeksiyon işlemleri kullanılmaktadır. Ancak aşındırıcı olduğu bilinen sodyum hipoklorit gibi klorlu bileşiklere maruziyet ciltte, solunum ve sindirim sisteminde rahatsızlıklara neden olabilmektedir (García, 2019).

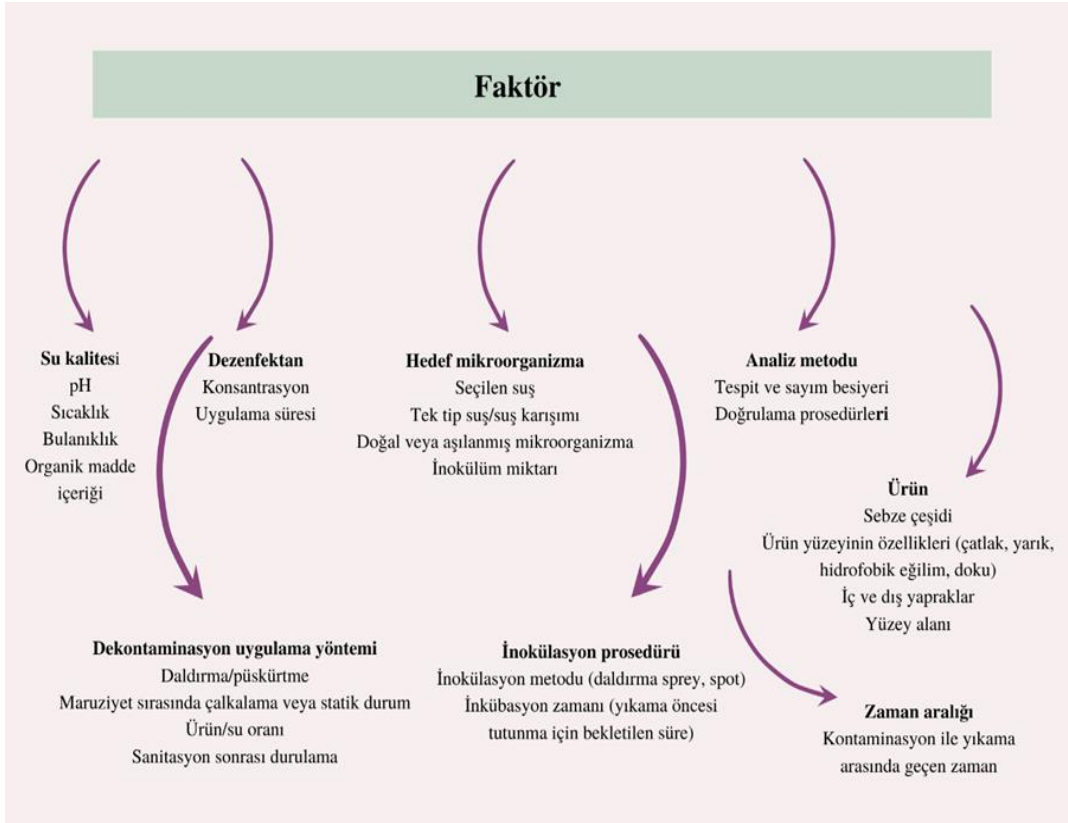
Bitkiler, otlar ve baharatların birçoğu fenolik bileşikler, terpenoidler, aldehitler ve esterler tarafından zengindir. Bu ikincil metabolitlerin mikroorganizmaların inhibisyon veya inaktivasyonunda etkin olduğu bilinmektedir (Davidson vd., 2013). Bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar, ekstraktlar ve organik asitler meyve-sebzelerin dekontaminasyonunda klor bazlı bileşiklere alternatif olabileceği düşünülmektedir. Meyve-sebzelerde mikrobiyal yükü azaltmak amacıyla bitki esansiyel yağları ve diğer dekontaminasyon ajanlarının kullanıldığı bazı çalışmalar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4

Doğal antimikrobiyal maddelerin dekontaminasyonda kullanıldığı bazı çalışmalar

Antimikrobiyal madde	Mikroorganizma	Gıda	Referans
CIO ₂ (10mg/mL), ozonlu su (9,7mg/L), kekik yağı süspansiyonu (1mL/L)	<i>E. coli</i> O157:H7	Marul Havuç	Singh vd., (2002)
Kekik, biberiye esansiyel yağı	<i>L. monocytogenes</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>A. hydrophila</i>	Marul Pancar Roka	Azeredo vd., (2011)
Limon otu, kekik esansiyel yağı, parasetik asit	<i>B. cinerea</i>	Çilek	Abd-Alla vd., (2011)
Asetik asit (%2, (v/v))	<i>L. monocytogenes</i>	Marul Salatalık Maydonoz	Nastou vd., (2012)
Beyaz sirke, limon suyu özütü, kekik yağı	<i>S. Typhimurium</i>	Çilek	Shahi vd., (2015)
Kekik, biberiye esansiyel yağı	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>S. Enteritidis</i>	Marul Pazı	Barbosa vd., (2016)
Beyaz hardal esansiyel yağı	<i>E. coli</i>	Marul	García, (2019)
Limon kabuğu ve nane uçucu yağı	<i>E. coli</i> ATCC 25933	Marul Maydanoz Dereotu	İrkin vd., (2021)

Farklı dezenfeksiyon yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi, proses yıkama suyunun fizikokimyasal özellikleri ve ürün tipi gibi çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Şekil 5). İnokülasyon yöntemi ve süresi, dekontaminasyon yöntemi ve süresi, dezenfektan türü, su kalitesi, uygulanan ürün, inoküle edilen mikroorganizma, mikroorganizmanın geri kazanım yöntemi gibi faktörler dekontaminasyon işlemlerinin deneysel sonuçlarını etkileyen faktörlerdir. Bu yüzden farklı uygulamalar arası etkinlik karşılaştırmalarının yapılmasının zor olduğu bilinmektedir (Gil vd., 2009).



Şekil 5. Dekontaminasyon işlemlerinin deneysel prosedürlerini etkileyen faktörler (Gil vd., 2009)

2.9. Modifiye Atmosfer Paketleme

Modifiye atmosfer paketleme (MAP) teknolojisi taze ‘tüketime hazır’ sebzeler dahil olmak üzere minimum düzeyde işlenmiş sebzeler için, solunumu azaltarak raf ömrünü uzatma amacıyla uygulanmaktadır (Sandhya, 2010). Tohum, meyve, yaprak veya kök gibi bitki kısımları hasattan sonra da varlığını sürdürmeye devam etmektedir. Bitkilerin hayatta kalmak ve olgunlaşmak için gereksinim duydukları bu enerji aerobik solunum ile

gerçekleşmektedir (O₂ tüketimi- CO₂ Üretimi) (Gorris ve Peppelenbos, 2020). Modifiye atmosfer paketleme paket içindeki gazlı bileşimi aktif veya pasif bir şekilde dinamik olarak değiştirme işlemidir. Pasif modifiye atmosfer ürünün solunum sürecine ve kullanılan ambalajın film geçirgenliğine bağlı olarak zamanla istenen gaz bileşimini elde etmeye dayanmaktadır (Caleb vd., 2013). Aktif modifiye atmosfer paketleme ise ambalaj atmosferinin istenen gaz bileşimiyle değiştirilmesiyle gerçekleşmektedir. O₂, CO₂ ve etilen tutucu gibi aktif maddeler ile bu değişim gerçekleşmektedir (Kader vd., 1989).

Paket içinde değiştirilmiş atmosfer koşulları bozulmaya sebep olan mikroorganizmaları inhibe ederken, bazı patojenlerin gelişmesini destekleyebileceği belirtilmektedir. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* gibi psikrotrofik gıda patojenleri ve proteolitik olmayan *C. botulinum* ve *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 ve *Sgihella* spp. modifiye atmosfer paketli gıdalarda risk oluşturabilmektedir (Farber vd., 2003).

Sebzelerin toprak ile teması ve kontamine su ile sulanma olasılığı nedeniyle sebzelerin mikrobiyal kontaminasyonu bir halk sağlığı sorunu olmuştur (Lilly vd., 1996). Sebzelerin modifiye atmosfer paketlenmesinde bozulmaya sebep olabilecek aerobik mikroorganizmalar engellenmesine rağmen, azalan O₂ seviyesi *Clostridium* spp.'lerin vejetatif hale geçmesi ve toksin üretimi için anaerobik ortam oluşturabileceği ifade edilmiştir (Lilly vd., 1996).

Modifiye atmosfer ile paketlenmiş farklı gıda gruplarında anaerob mikroorganizmaların gelişmesini araştıran çalışmalar literatürde mevcuttur Chen ve Hotchkiss, (1993), geleneksel olarak paketlenmiş süzme peynirde, *L. monocytogenes* 4 ve 7°C'de sırasıyla 28 ve 7 günlük gecikme fazlarından sonra 3 log yükselmiştir. CO₂ ile paketlenmiş peynirlerde ise, 4°C'de depolananlarda 63 güne kadar *L. monocytogenes* gelişmemiş, 7°C'lerde depolananlarda ise 1 log artmıştır. Peynirlere inoküle edilen *C. sporogenes* ise hiçbir koşulda gelişmemiştir.

Haşlanmış yumurtaların modifiye atmosfer ile paklendiği bir çalışmada (Claire vd., 2004), 4, 8 ve 12 °C'de saklanan tüm örneklerde gaz karışımına ve sıcaklığa bağlı olarak *L. monocytogenes* yükü 3-20 günde 4 log artmıştır. 12°C'de 21 gün depolama sonunda *C.*

botulinum nörotoksini saptanamamışken, başlangıçta 12°C’de saklanan ve daha sonra 7 gün daha 25°C’de depolanan tüm örneklerde nörotoksin saptanmıştır.

Bir çalışmada (Arritt vd., 2007), modifiye atmosfer ile paketlenmiş balık filetolarında *C. botulinum* toksin gelişiminin mikrobiyolojik bozulmadan önce gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmış ve balıkların 4°C’de depolamada 15. günde bozulduğunu fakat 35 günlük depolamadan sonra bile toksin oluşmadığını belirtmişlerdir. 10°C’de depolamada 8. günde toksin üretiminin meydana geldiğini ancak bu sıcaklıkta depolamanın 5. Gününde bozulma ve duyuusal reddin meydana geldiğini ifade etmişlerdir.

Modifiye atmosfer paketli gıdalarda *C. difficile* varlığını araştıran çalışmalar sınırlıdır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada (Atasoy ve Gücükoğlu, 2017) MAP uygulanmış sığır kıyma örneklerinin %4’ünde ve sığır kuşbaşı örneklerinin %2’sinde *C. difficile* saptanmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri izolatlar arasında toksinojenik karaktere sahip izolatlar olduğunu belirtmişler ve klindamisine karşı sadece toksin A içeren izolatın dirençli olduğunu, diğer izolatların vankomisin ve metronidazole duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Carvalho vd., (2019) vakum veya modifiye atmosfer paketlenmiş 143 et örneğinin hiçbirinde *C. difficile* saptamamışlardır.

Sebzelerde hasat sonrası solunumun devam ettiği ve *C. difficile*’nin O₂ toleransı (Kint vd., 2020; Morvan vd., 2021) düşünüldüğünde, MAP uygulanan sebzelerde depolama boyunca azalan O₂ ve artan CO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak *C. difficile*’nin çimlenme olasılığı risk oluşturmaktadır. Flock (2017) 4°C’de 10 gün depolama sonunda marullara inoküle edilen *C. difficile* sporlarının canlılığını koruduğunu ifade etmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda ve MAP koşullarında depolamanın *C. difficile*’yi çimlenmeye teşvik edip etmeyeceği halen net değildir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Planı

Çalışmamız birbirini takip eden 5 ana araştırmadan oluşmaktadır. Her araştırmada materyal ve metot ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

1. araştırma: Aydın, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Düzce, Manisa ve İzmir illerinden temin edilen marullarda *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. Elde edilen izolatlar MALDİ-TOF MS ve API 32A ile tanımlanmış ve izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir.

2. araştırma: 23 farklı doğal antimikrobiyal maddenin *C. difficile*, *C. perfringens* ve *C. sporogenes*'in vejetatif formu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi hem disk difüzyon hem de agar kuyucuk yöntemi ile araştırılmıştır. Etkili bulunan yağların MİK ve MBK değerleri belirlenmiş ve en etkin 3 maddenin uçucu yağ profilleri GC-FID-MS'de belirlenmiştir. Aynı zamanda en etkin 2 maddenin birbirleriyle ve *C. difficile* enfeksiyonlarında tedavide kullanılan antibiyotiklerden biri olan vankomisinle aralarındaki sinerjistik aktivite belirlenmiştir. Ek olarak bu maddelerin *C. difficile* üzerindeki antibiyofil aktivitesi araştırılmıştır.

3. araştırma: Vejetatif forma karşı etkin bulunan doğal antimikrobiyal maddelerin sporlar üzerindeki aktivitesi araştırılmıştır. Sporlara karşı etkili olan MİK değerleri belirlenmiştir. En etkin bulunan doğal maddenin *C. difficile* sporlarına karşı sporisidal aktivitesi çalışılmış ve matematiksel modellemesi yapılmıştır.

4. araştırma: Marullarda olası bir *C. difficile* kontaminasyonuna karşı etkili olabilecek doğal dezenfektan geliştirilmesi amaçlanmıştır. Üçüncü çalışmada etkili olan esansiyel yağ ve organik asit kombinasyonu farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanarak marullara inoküle edilen *C. difficile*'nin uzaklaştırılması çalışılmıştır. Aynı zamanda oluşturulan yıkama solüsyonunun marullardaki toplam yük ve Enterobacterales yüküne etkisi belirlenmiştir. Bununla birlikte uygulanan dekontaminasyon işlemlerinin marulların fiziksel ve kimyasal özelliklerine olan etkisi de araştırılmıştır.

5. araştırma: *C. difficile* inoküle edilen ve modifiye atmosfer paketlenen marullarda 4 ve 10°C’de 10 gün depolama sonunda paket içinde azalan O₂ konsantrasyonu ile birlikte *C. difficile* sporunun çimlenip gelişme riski araştırılmıştır. Bir önceki çalışmada seçilen en uygun konsantrasyon ve sürelerde yıkanan marullar kontrol gruplarıyla birlikte modifiye atmosfer paketlenmiş ve depolama takip edilmiştir. Aynı zamanda depolamanın ve yıkama uygulamalarının toplam yük ve Enterobacterales sayısına olan etkisi de araştırılmıştır. Bunun yanında marulların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişimi de incelenmiştir.

3.2. Araştırma 1. Marullarda *C. difficile* Varlığının Belirlenmesi

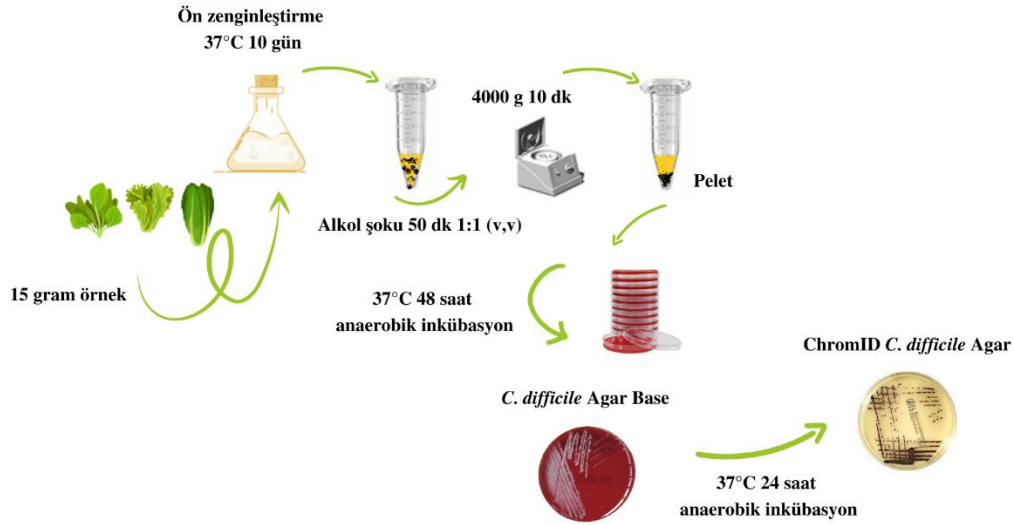
3.2.1. Materyal

Aydın (6), Balıkesir (23), Bursa (3), Çanakkale (37), İzmir (30), Manisa (4) illerinden market veya yerel pazarlardan Kasım 2020- Nisan 2022 aralığında alınan kıvrıcık (*Lactuca sativa* var. *crispa*), kaşık (*Lactuca sativa longifolia*) ve atom (*Lactuca sativa* var. *capitata*) maruldan oluşan 107 adet örnekte *C. difficile* varlığı araştırılmıştır.

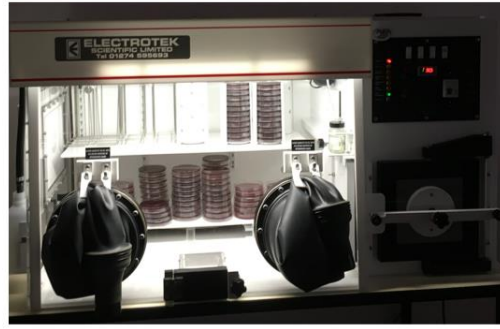
3.2.2. İzolasyon

C. difficile aranmasında Pasquale vd., (2012) ve Rodriguez-Palacios vd., (2014)’nin yöntemi kullanılmıştır (Şekil 6). 10 gram marul örneği 40 mL *C.difficile* Enrichment Broth (CDEB) (Proteaz pepton (40 g/L, Oxoid, İngiltere), fruktoz (6g/L, Merck, Almanya), Na₂HPO₄ (5g/L, İsoLab, Almanya), KH₂PO₄ (1g/L, Carlo Erba, Fransa), MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L, Alfa aesar, Almanya), NaCl (2g/L, Merck, Almanya), sodyum taurokolat (1g/L, Merck, Almanya), *C.difficile* cycloserine-cefoxitin (CC) selective supplement (HiMedia, Hindistan) besiyerinde 35-36°C’de 10 gün anaerob koşullarda ön zenginleştirilmiştir (Şekil 7). Bu sürenin sonunda vejetatif hücrelerin ortadan kalkması amacı ile zenginleşen sıvıya 1:1 (v/v) oranında etil alkol ile 50 dk alkol şoku uygulanmış ve ardından 4000 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken pelete 50 µL serum fizyolojik (%0,85/v,v) eklenmiştir. Serum fizyolojik eklenen pelet, CDCC Agar’a (*Clostridium difficile* Agar Base (HiMedia, Hindistan) L-cysteine (%0,1, Merck, Almanya), at kanı (%7, Liofilchem, İtalya) Cycloserine-Cefoxitin, sodyum taurokolat (%0,1)) inoküle edilmiş ve 35-36°C’de anaerob koşullarda 24-48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 7). Ardından seçiciliğin artırılması amacıyla CDCC besiyerinde *C. difficile* olduğu düşünülen koloniler

ChromID *C. difficile* Agar (biomerieux, Fransa)'a çizilmiştir. 35-36 C'de 24 saat inkübasyon sonunda petrilerdeki siyah kolonilerden izolat alınmıştır. İzolatlar -18°C'de tanımlanmak üzere saklanmıştır.



Şekil 6: *C. difficile*'nin marullardan izolasyonu



Şekil 7. Marullardan *C. difficile* aranmasında inkübasyon görüntüleri (a) Ön zenginleştirme (b) selektif besiyeri

3.2.3. İzolatların Tanımlanması

MALDI-TOF MS

Gram boyama sonucu Gram (+) ve basil olduğu belirlenen izolatlar MALDI-TOF MS (Bruker Microflex LT, Almanya) ile Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvar'ında tanımlanmıştır. Tanımlamada Flex Control 3.0 yazılımı kullanılmıştır. Asetonitril (Sigma-Aldrich, Amerika), triflora asetik asit (Sigma-

Aldrich, Amerika), DNaz ve RNaz içermeyen ultra saf su (Sigma-Aldrich, Amerika) ve *E. coli*, RNaz ve miyogloblin protein kılıfı içeren Bruker bakteriyel test solüsyonu kullanılmıştır. Steril bir kürdan yardımıyla her izolattan tek bir koloni alınarak çelik plakaya (Bruker Daltonics, Almanya) direkt transfer yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve plakadaki oyuklara yayılmıştır. Plaka kurduktan sonra üzerine 1µL matriks solüsyonu (50% asetonitril varlığında 12,5 mg/ml α-cyano-4-hydroxycinnamic asit ve 2,5% triflora asetik asit karışımı) ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında tamamen kuruması sağlanmıştır. Çelik plak MALDI-TOF MS cihazına yerleştirildi. Sistem 2.000-20.000 Dalton (Da) kütle aralığında doğrusal pozitif iyon modunda mikroorganizmaların tanımlanması için optimize edilmiş yöntem kullanılarak çalıştırıldı. İyon kaynağı olarak 337 nm'de 60 Hz nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumları elde etmek için her örneğin ölçümünde toplamda 240 olacak şekilde 40'arlık paketten oluşan lazer darbeleri uygulanmıştır. Her örnek üç paralel analiz olacak şekilde çalışılmıştır.

API 32A

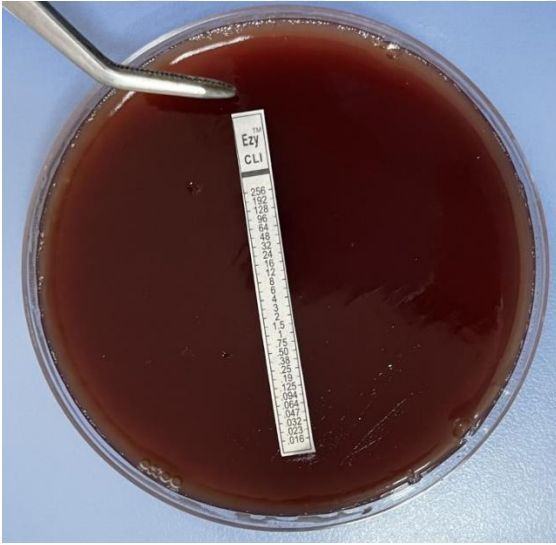
Gram (+) ve basil olduğu belirlenen izolatlar API 32A (bioMerieux, Fransa) ile tanımlanmıştır (Şekil 8). 24 saatlik aktif kültürler üreticinin talimatları doğrultusunda McFarland 4 seviyesinde ayarlanarak kitteki kuyucuklara ilave edilmiştir. Aerob ortamda 4 saat sonunda prosedürdeki talimatlara göre reaktifler kuyucuklara ilave edilmiş ve sonuçlar APIWEB™ yazılımında (versiyon 1.3.0) değerlendirilmiştir.



Şekil 8. İzolatların API 32A ile tanımlanması

3.2.4. İzolatların Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi

İzolatların vankomisin, klindamisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları E-test yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2012) 25mL Brucella Agar (Himedia, Hindistan) (5µg/mL Hemin (Sigma, Amerika), 1µg/mL K vitamini (Roche, Almanya) %5 (v/v) koyun kanı (Liofilchem, İtalya) içeren plaklara 0,5 McFarland seviyesine seyreltilen kültürler steril swab yardımı ile yayılmıştır. Steril bir pens yardımıyla üreticinin talimatları doğrultusunda 0,016-256 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda E-test şeritleri (Himedia, Hindistan) plaklara yerleştirilmiştir (Şekil 9). 35-36°C 48 saat inkübasyonun ardından minimum inhibisyon konsantrasyonları E test şeritleri etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta üzerinden belirlenmiştir.



Şekil 9. E-testin yerleştirilmesi

3.3. Araştırma 2. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile *C. difficile* Vejetatif Formunun Kontrolü

3.3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamızda *C. difficile* ATCC 700057 (ribotip 038, A⁻ B⁻ CDT⁻) ve *C. difficile* ATCC 43593 (ribotip 060, A⁻ B⁻ CDT⁻) olmak üzere 2 toksinojenik olmayan, *C. difficile* ATCC 1870 (ribotip 027, A⁺ B⁺ CDT⁺) ve *C. difficile* ATCC 9689 (ribotip 001, A⁺ B⁺ CDT⁻) olmak üzere 2 adet toksinojenik suş, *C. perfringens* ATCC 12915 ve *C. sporogenes* ATCC 11437 (Microbiologics, Amerika) kullanılmıştır.

3.3.2. Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan doğal antimikrobiyal maddelerden (Tablo 5) *Juniperus communis* (Ardıç), *Terebinthinae* (Çam-terebentin), *Cuminum cyminum* (Kimyon), *Laurus nobilis* (Defne), *Cananga odorata* (Ylang Ylang), *Jasminum officinale* (Yasemin), *Cinnamomum zeylanicum* (Tarçın), *Cedrus atlantica* (Sedir), *Brassica nigra* (Hardal), *Allium sativum* (Sarımsak), *Petroselinum* sp. (maydanoz tohumu), *Melaleuca alternifolia* (Çay ağacı), *Chlorophyta* (Yosun), *Urtica* sp. (Isırgan tohumu), *Prunus amygdalus var.amara* (Acıbadem), *Zingiber officinale* (zencefil), *Cucurbita pepo* (Kabak çekirdeği), *Menthae piperitae* (Nane), *Lavandula angustifolia* miller (Lavanta), *Pimpinella anisum* (Anason) yağları, Propolis ekstraktı (Arifoğlu, Türkiye) ve *Citrus limonum* (Limon) yağı ile *Cucumis melo* (kavun yağı, Naturoil, Türkiye) ticari olarak satın alınmıştır. *Myrtus communis* (Mersin) yağı ise Balıkesir Çiftçi Eğitim Merkezi (BAÇEM)'de buhar destilasyonu ile elde edilmiştir.

Tablo 5

Kullanılan doğal antimikrobiyal maddeler

Bitki	Yaygın isim	Elde edilmiş yöntemi
<i>Propolis</i>	Propolis ekstraktı	Su bazlı
<i>Allium sativum</i>	Sarımsak	Zeytin yağında bekletme
<i>Brassica nigra</i>	Hardal	Soğuk pres
<i>Cananga odorata</i>	Ylang ylang	Su buharı destilasyonu
<i>Cedrus atlantica</i>	Sedir	Su buharı destilasyonu
<i>Chlorophyta</i>	Yosun	Su buharı destilasyonu
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Tarçın	Su buharı destilasyonu
<i>Citrus limonum</i>	Limon	Su buharı destilasyonu
<i>Cucumis melo</i>	Kavun	Su buharı destilasyonu
<i>Cucurbita pepo</i>	Kabak çekirdeği	Soğuk pres
<i>Cuminum cyminum</i>	Kimyon	Su buharı destilasyonu
<i>Jasminum officinale</i>	Yasemin	Su buharı destilasyonu
<i>Juniperus communis</i>	Ardıç	Su buharı destilasyonu
<i>Laurus nobilis</i>	Defne yaprağı	Su buharı destilasyonu

Tablo 5'in devamı

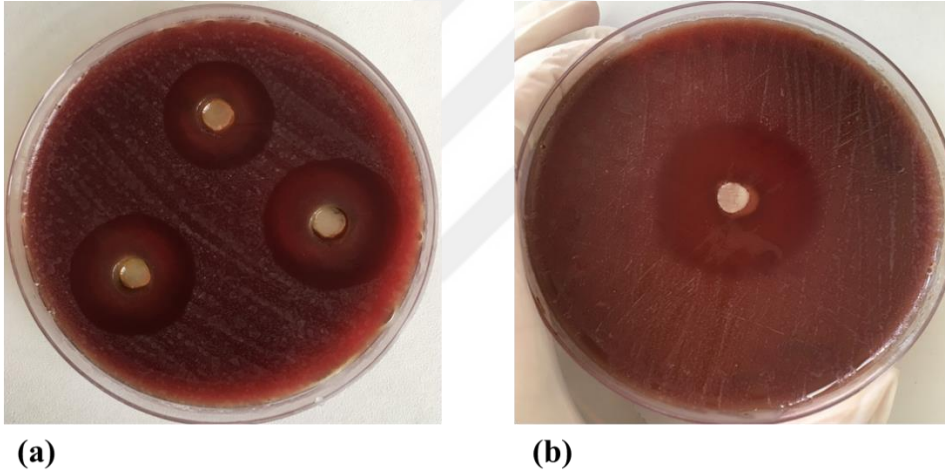
<i>Lavandula angustifolia</i> miller	Lavanta	Su buharı destilasyonu
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Çay ağacı	Su buharı destilasyonu
<i>Menthae piperitae</i>	Nane	Su buharı destilasyonu
<i>Myrtus communis</i>	Mersin	Su buharı destilasyonu
<i>Petroselinum</i> sp.	Maydanoz tohumu	Soğuk pres
<i>Prunus amygdalus</i> var.amara	Acıbadem	Soğuk pres
<i>Terebinthinae</i>	Çam-Terebentin	Su buharı destilasyonu
<i>Urtica</i> sp.	Isırgan tohumu	Soğuk pres
<i>Zingiber officinale</i>	Zencefil	Su buharı destilasyonu

3.3.3. Agar Kuyucuk Yöntemi

Bitki esansiyel yağlarının *C. difficile* vejetatif hücreleri üzerindeki etkisi (Roshan vd., 2017)'nin yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. %0,05 Yeast Extract (Merck, Almanya), %0,1 L-cysteine, K₁ vitamini (0,1µg/mL), hemin (0,5µg/mL) ve koyun kanı (%5, v/v) ilave edilen 25 mL Brucella Agar besiyeri petrilere dökülmüştür. Katılma sırasında kapakta nem oluşturmaması amacıyla hazırlanan besiyerleri petrilere hava akışı olan güvenlik kabinde dökülmüştür. Daha önceden Brain Heart Infusion Agar (%0,05 Yeast Extract, %0,1 L-cysteine, K₁ vitamini, Hemin, koyun kanı)'da 35-36°C'de anaerobik ortamda 24 saat aktiveleştirilen *Clostridium* kültürleri serum fizyolojik ile McFarland cihazında ölçülerek 8 log/kob seviyesine getirilmiştir. McFarland ayarı yapılan kültürlerden 100 µL alınarak Brucella Agar (Sigma) plaklara steril swab ile yayılmıştır. Ardından steril cork borer ile besiyeri üzerinde 4 mm kalınlık ve 8 mm çapta kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara 100 µL esansiyel yağ ilave edilmiş ve pozitif kontrol amacıyla antibiyotik disk (Vankomisin (30mg), Oxoid, İngiltere) ve negatif kontrol amacıyla bitki esansiyel yağların çözgeni olan dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, Almanya) kullanılmıştır (Şekil 10). Petriler 35-36°C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zonu ölçülmüştür.

3.3.4. Disk Difüzyon Yöntemi

Esansiyel yağların disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi Erikstrup vd., (2012)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. CLSI (2012)'nin önerisiyle %5 koyun kanı katkılı Brucella Agar (HiMedia, Hindistan) besiyeri olarak kullanılmıştır. 24 saat aktif hale getirilen kültürler serum fizyolojik ile 8 log/kob'e seyreltilmiş ve Brucella Agar plaklara steril swab ile yayılmıştır. Ardından antimikrobiyal özellikleri test edilecek yağlar kağıt disklerle (6 mm çap) emdirilerek, plaklara yerleştirilmiştir (Şekil 10). 35-36°C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda inkübasyonun sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Pozitif kontrol amacıyla vankomisin (30µg/disk), negatif kontrol amacıyla DMSO kullanılmıştır.



Şekil 10. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi (a) agar kuyucuk yöntemi (b) disk difüzyon yöntemi

3.3.5. Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi

Agar kuyucuk ve disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zonları belirlenen doğal antimikrobiyal maddelerin pozitif kontrol grubu olan antibiyotikle oluşturdukları zon çapları karşılaştırılmış ve etkili bulunan yağların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) mikrodilüsyon yöntemi ile (CLSI, 2012) belirlenmiştir. 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplaklara %0,05 Yeast Extract, %0,1 L-cysteine, K₁ vitamini, Hemin katkılı Brucella Broth, 8 log/kob seviyesine ayarlanmış aktif kültür ve seri konsantrasyonları hazırlanmış esansiyel yağlar ilave edilmiştir. 35-36°C 48 saat anaerob şartlarda inkübasyonun ardından

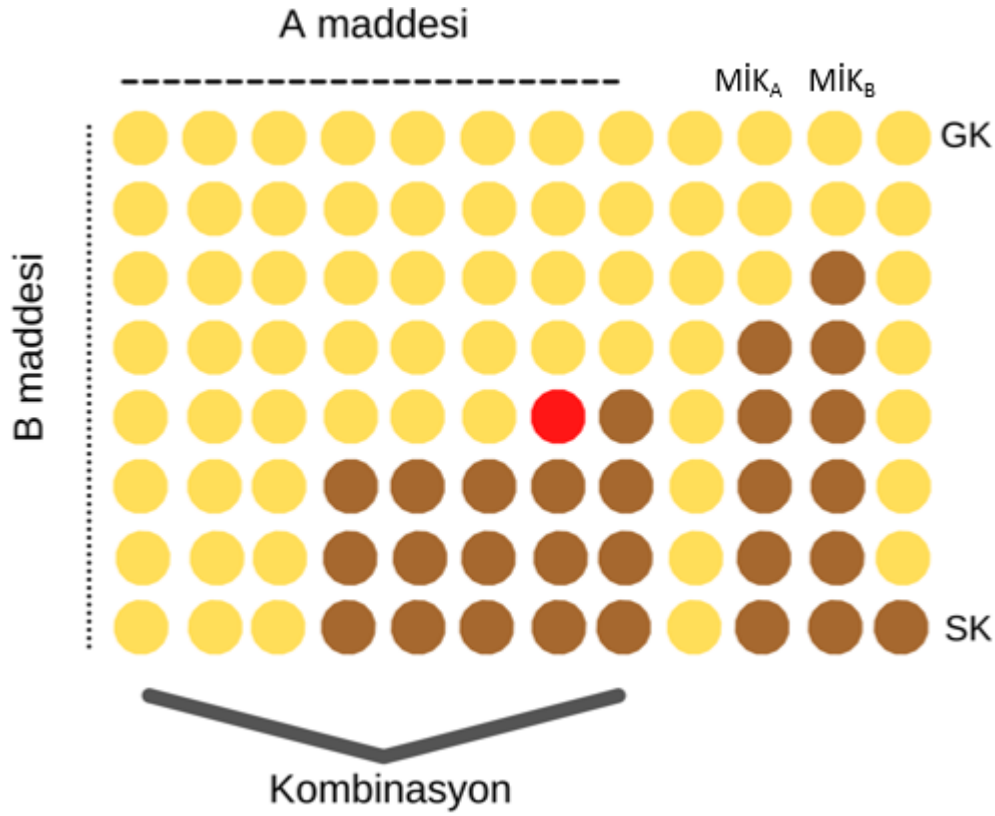
plaklar 620 nm’de mikropalak okuyucuda (Thermo scientific, Multiscan FC, ABD) okunarak ve üremenin gerçekleşmediği minimum konsantrasyon, esansiyel yağların MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Kuyucuklara 20 µL 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (Merck, Almanya) ilave edilerek gelişme kontrol edilmiştir. İlk kuyucuktaki DMSO’nun son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Antimikrobiyal maddelerin minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) Brucella kanlı agar plakalarına hiçbir gelişme gözlenmeyen kuyucuklardan 10µl inoküle edilerek belirlenmiştir. 35-36°C’de 48 saatlik anaerobik inkübasyon sonunda %90 azalma sağlayan konsantrasyon MBK olarak belirlenmiştir (Şengün vd., 2020).

3.3.6. Dama Tahtası Sinerji Testi

C. difficile’nin vejetatif formuna karşı antimikrobiyal etkisinin en yüksek olduğu belirlenen tarçın ve çay ağacı esansiyel yağlarının ve tarçın esansiyel yağının vankomisin ile kombinasyonunun MİK değerleri üzerindeki etkisi dama tahtası testi ile 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalaklar kullanılarak belirlenmiştir (Shahverdi vd., 2007). Tüm kuyucuklara 50 µL Brain Heart Infusion Broth ((%0,05 Yeast Extract, %0,1 L-cysteine, K₁ vitamini, Hemin) dağıtılmıştır. Mikropalakta ilk sütuna (A-H) çay ağacı yağından 50 µL aktarılmıştır. Soldan sağa doğru (1-8) çay ağacı yağı seri seyreltilmiştir. İlk satıra (1-8) 50 µL tarçın yağı aktarılmıştır. Yukarıdan aşağı doğru (A-H) tarçın yağı seri seyreltilmiştir. 9. ve 10. sütunlara test edilen antimikrobiyal maddelerin seri dilüsyonları aktararak tek başlarına oluşturdukları MİK değerlerinin saptanması amaçlanmıştır. Ardından kuyucuklara 8 log/kob seviyesine ayarlanmış aktif *C. difficile* ATCC 1870 suşundan 50 µL ilave edilmiştir. Gelişme kontrolü olarak kuyucuklardan birine sadece besiyeri ve mikroorganizma, sterilite kontrolü amacıyla ise kuyucuklardan birine sadece besiyeri aktarılmıştır. Tüm adımlar tarçın yağı ve vankomisin kombinasyonu için de izlenmiştir (Şekil 11).

37°C’de 48 saat anaerob şartlarda inkübasyon sonunda kuyucuklardaki gelişme değerlendirilmiş ve Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) aşağıdaki formüle göre hesaplanarak antimikrobiyal maddeler arasındaki sinerji belirlenmiştir. Sonuçlar FİK ≤0.5 (sinerji), FİK> 0.5-4.0 (interaksiyon yok), FİK> 4.0 (antagonist) şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 11. Dama tahtası yönteminin şematik gösterimi

Sarı kuyucuklar mikrobiyal gelişme olmayan kuyucukları, kahverengi kuyucuklar mikrobiyal gelişme olan kuyucukları, kırmızı kuyucuk ise fraksiyonel inhibitör konsantrasyonunu (FİK) göstermektedir. $MİK_A$: A maddesinin MİK değeri, $MİK_B$: B maddesinin MİK değeri, GK: Gelişme kontrolü, SK: Sterilite kontrolü

3.3.7. Esansiyel Yağların Antibiyofilm Yeteneklerinin Belirlenmesi

C. difficile suşlarının biyofilm kapasiteleri kristal viyole mikrotitre plak yöntemi ile 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanılarak belirlenmiştir (Hammond vd., 2014). Her kuyucuğa 6log/kob düzeyinde 20 μ L kültür ve 180 μ L BHI Broth eklenmiştir. Kültür ilave edilmeyen kuyucuklar negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Plaklar anaerobik koşullarda 35-36°C'de 48 saat inkübasyonun ardından boşaltılmış ve her kuyucuk tutunamayan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile 3 kez 200 μ L PBS ile yıkanmıştır. Plaklar 60°C'de 1 saat kurutulmanın ardından, kuyucuklara 150 μ L %1'lik kristal viyole eklenerek 5 dakika beklenmiştir. Süre sonunda plaklar su ile yıkanmış ve 60°C'de 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Tutunan hücrelere yapışan boyanın çözünmesi için her kuyucuğa 150 μ L

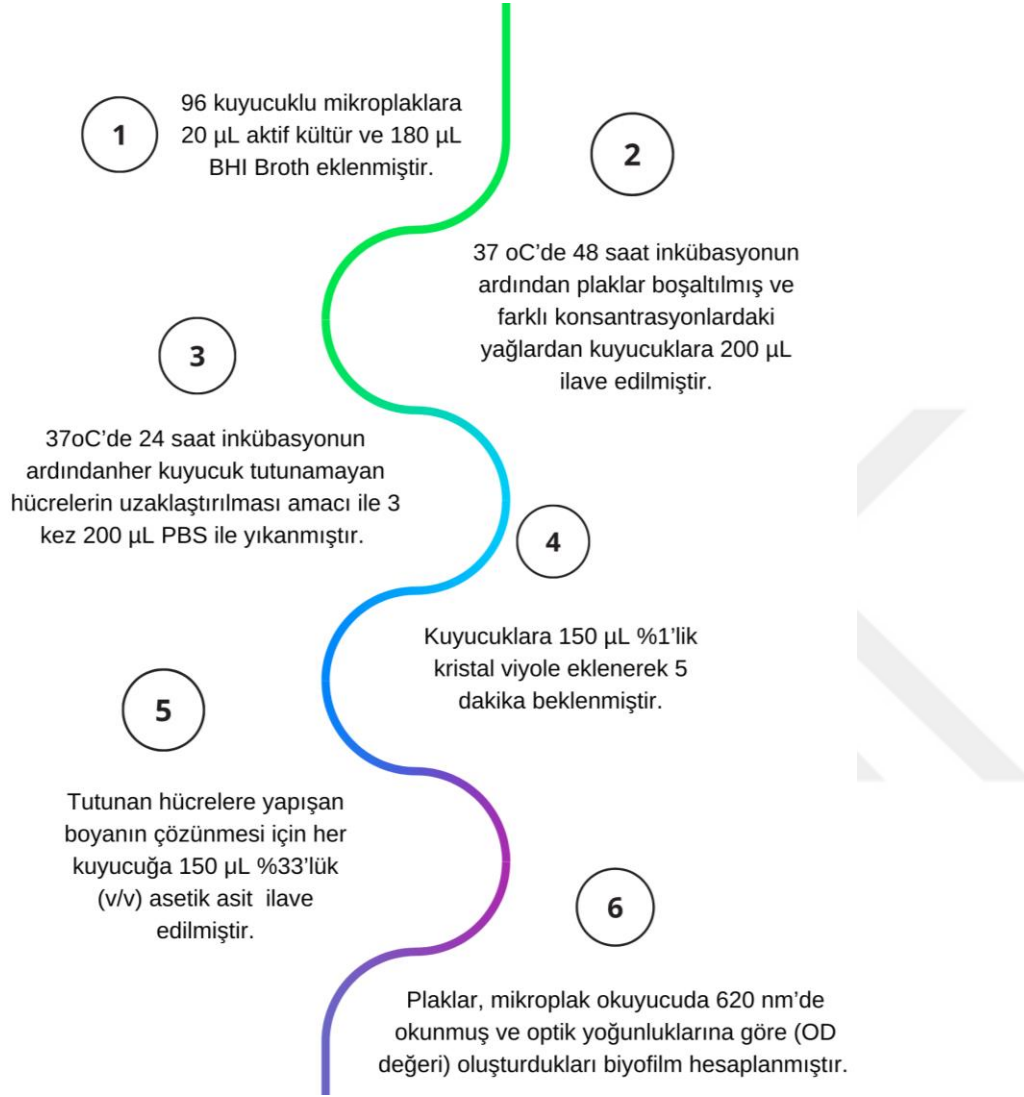
%33'lük (v/v) asetik asit (Sigma, Amerika) ilave edilmiştir (Şekil 12, 13). Plaklar, spektrofotometrede (Thermo scientific, Multiscan FC, Amerika) 620 nm'de okunmuş ve optik yoğunluklarına göre (OD değeri) oluşturdukları biyofilm hesaplanmıştır. Her kültür için analiz 3 kez tekrar edilmiştir (Donelli vd., 2012). Negatif kontrolün 3 kez ölçülecek OD değerlerinin ortalaması (ODc) üzerinden izolatların tutunma yetenekleri (Stepanović vd., 2000)'e göre belirlenmiştir.



Şekil 12. Biyofilm analizinin akış şeması

Antibiyofilm aktivite için 96 kuyucuklu mikroplaklara 20 µL aktif kültür ve 180 µL BHI Broth eklenmiştir. 35-36°C'de 48 saat inkübasyonun ardından plaklar boşaltılmış ve farklı konsantrasyonlardaki yağlardan kuyucuklara 200 µL ilave edilmiştir (Şekil 14). 35-36°C'de 24 saat inkübasyonun ardından yıkama işlemleri 3.4.4.1.'de anlatıldığı şekilde

gerçekleşmiştir. 620 nm’de spektrofotometrede okumanın ardından yağların antibiyofilm aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Hammond vd., 2014).



Şekil 13. Antibiyofilm analizinin akış şeması

3.3.8. Esansiyel Yağların Uçucu Yağ Profillerinin GC-FID-MS ile Belirlenmesi

En etkili üç yağın uçucu yağ profilleri Prof. Dr. Serkan Selli ve Öğr. Gör. Onur Sevindik tarafından Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (ÇÜMERLAB)’nda belirlenmiştir. Gaz kromatografi sistemi (GC–MS) Agilent7000D, FID (alev iyonizasyon dedektörü) arayüzlü üçlü dört kutuplu GC–MS sisteminden oluşmaktadır. Numunelerin uçucu maddelerini ayırmak için DB-Wax kolonu (0,5µm kalınlık×0,25 mm i.d.×60 m

uzunluk; J&W Scientific, Folsom, CA) kullanılmıştır. Örnekler diklorometan (1:100, v/v) ile seyreltilmiştir. Üç µL ekstrakt, 0,5 dakika boyunca 40 psi'de bölünmüş olmayan darbe modu kullanılarak enjekte edilmiştir. Enjektör ve FID dedektör sıcaklıkları sırasıyla 270 ve 280°C olarak belirlenmiştir. Helyum akış hızı 1,5 ml/dk akış hızı ile taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. DB-Wax kolon fırın programının parametresi, dakikada 4°C ve 10 dakika bekletme ile 50 ila 250°C arası tutulmuştur. Bu fırın parametreleri MSD için de kullanılmıştır. MS (elektronik darbeleri iyonizasyon) parametreleri saniyede 2,0 tarama hızı, 70 eV iyonizasyon enerjisi, kütle aralığı m/zof 30–300 a.m.u., 250°C arayüz sıcaklığı ve 180°C kaynak sıcaklığı olmuştur. Numunelerin uçucuları, ticari bir spektrum veri tabanı (Wiley 14, Flavor 2 L, NBS 75 k) kullanılarak DB-Wax kolon üzerindeki alıkonma indeksi, standart bileşikler ve kütle spektrumlarına dayalı olarak tanımlanmıştır. Tepki faktörleri, her bir uçucu maddenin 4-nonanole olan yoğunluk oranına göre hesaplanmış ve her bir bileşenin tepki faktörü kullanılarak pik alanlarının oranları düzeltilmiştir. Uçucuların alıkonma indeksi verileri n-alkan serisi (C₈–C₃₂) kullanılarak hesaplanmıştır (Sönmezdağ vd., 2018).

3.4. Araştırma 3. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile *C. difficile* Sporlarının Kontrolü

3.4.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

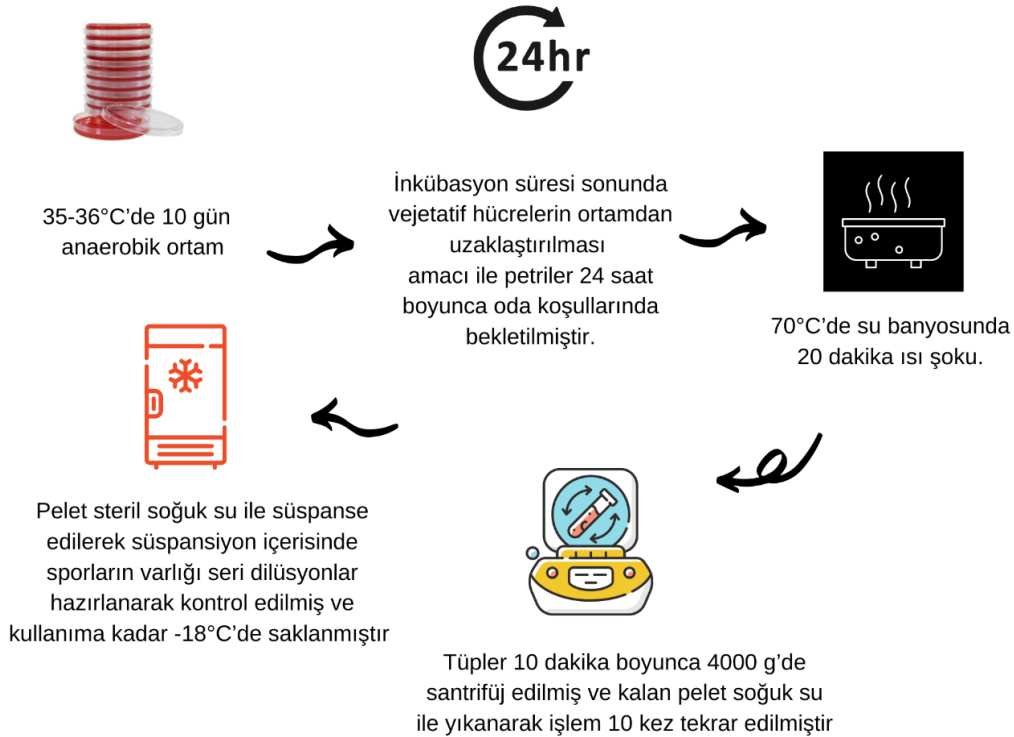
C. difficile ATCC 700057, *C. difficile* ATCC 43593, *C. difficile* ATCC 1870, *C. difficile* ATCC 9689, *C. perfringens* ATCC 12915, *C. sporogenes* ATCC 11437 (Microbiologics, Amerika) kullanılmıştır.

3.4.2. Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Maddeler

Juniperus communis (Ardıç), *Terebinthinae* (Çam-terebentin), *Cuminum cyminum* (Kimyon), *Laurus nobilis* (Defne), *Jasminum officinale* (Yasemin), *Cinnamomum zeylanicum* (Tarçın), *Melaleuca alternifolia* (Çay ağacı), *Zingiber officinale* (zencefil), *Menthae piperitae* (Nane), *Lavandula angustifolia* miller (Lavanta), ve *Citrus limonum* (Limon) yağları kullanılmıştır.

3.4.3. Spor Solüsyonlarının Eldesi

Clostridium kültürleri Brain Heart Infusion Agar (L-cystine+ K₁ vitamini+hemin)'da 35-36°C'de 10 gün boyunca anaerobik ortamda sporlanmaları için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda vejetatif hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile petripler 24 saat boyunca oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda petri yüzeyinden koloniler toplanarak steril soğuk su içerisinde tüplerde süspansiyon edilmiş ve vejetatif hücrelerin uzaklaştığından emin olmak amacı ile 70°C'de su banyosunda bakteri süspansiyonları 20 dakika tutularak ısı şoku uygulanmıştır. Ardından tüpler 10 dakika boyunca 4000 g'de santrifüj edilmiş ve kalan pelet soğuk su ile yıkanmış ve bu işlem 10 kez tekrar edilmiştir (Şekil 14). Son olarak pelet tekrar steril soğuk su ile süspansiyon edilmiş ve süspansiyon içerisinde sporların varlığı seri dilüsyonlar hazırlanarak kontrol edilmiştir. Her spor eldesinde sporların varlığı test edilmiş olup, süspansiyonlar kullanıma kadar -18°C'de saklanmıştır (Sorg ve Dineen, 2009).



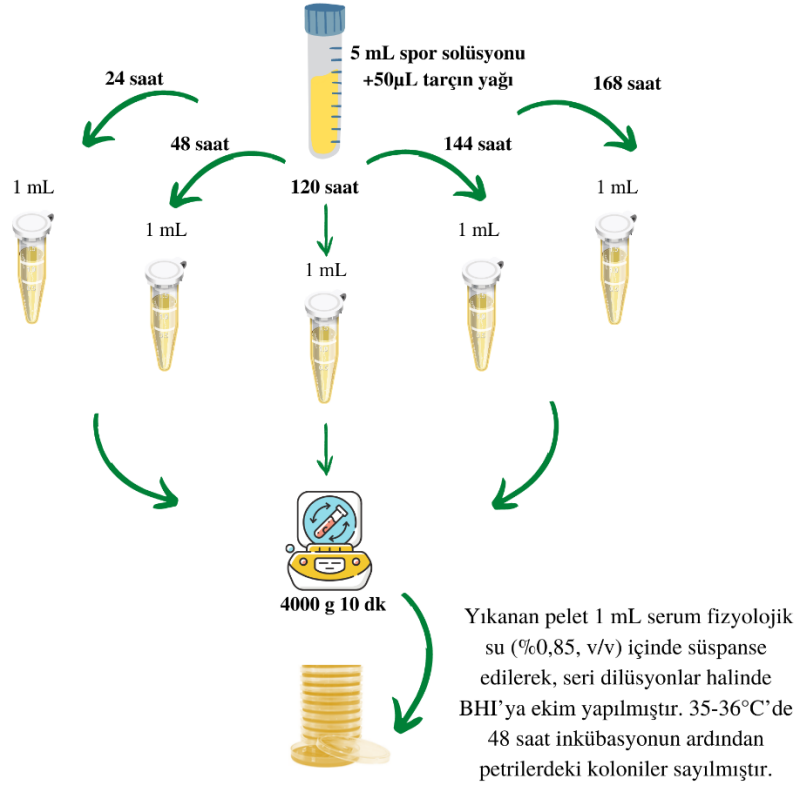
Şekil 14. Spor solüsyonunun eldesi

3.4.4. Antimikrobiyal Maddelerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Vejetatif hücrelere karşı MİK değerleri belirlenen yağların sporlara karşı değerleri de 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalaklar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2012). 50 µL BHI (Yeast Extract (%0.05), L-cysteine (%0,1), K₁ vitamini, Hemin), 50 µL 8 log/kob seviyesine ayarlanmış *C. difficile* sporu ve 50 µL seri dilüsyonları hazırlanmış yağlar kuyucuklara ilave edilmiştir. 35-36°C’de 48 saat anaerobik inkübasyon sonunda kuyucuklara 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride ilave edilerek gelişme kontrol edilmiş ve üreme olamayan minimum konsantrasyon sporlar için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.4.5. Sporisidal Aktivite

Tarçın esansiyel yağının sporisidal aktivitesi (Lawrence ve Palombo, 2009) ve Roshan vd., (2018)’nin yöntemine göre test edilmiştir. Hazırlanan spor solüsyonlarından 5 mL alınarak, 50 µL antimikrobiyal madde ile karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar 35-36°C’de 24, 48, 120, 144 ve 168 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her inkübasyon süresinin sonunda süspansiyonlardan 1 mL alınarak 4000g’de 10 dk santrifüj edilerek, %0,85’lik serum fizyolojik ile iki kez yıkanmıştır. Yıkanan pelet 1 mL %0,85’lik serum fizyolojik içinde süspanse edilerek, seri dilüsyonlar halinde BHI’ya ekim yapılmıştır. 35-36°C’de 48 saat inkübasyonun ardından petrilerdeki koloniler sayılmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. Sporisidal aktivite

3.4.6. Sporisidal Aktivitenin Matematiksel Modellemesi

Log-Linear Model

Sporisidal aktivitenin log-linear ile modellenmesi Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, 2010)'e eklenen GInaFiT Geeraerd ve Van Impe inaktivasyon programı versiyon 1.7 (Geeraerd vd., 2005)'ye göre yapılmıştır.

Bu modelde tarçın yağı ile temas ettirilmiş sporların inaktivasyonunun birinci derece kinetik modele göre meydana geldiği ve sporların antimikrobiyal uygulamaya eşit direnç gösterdiği varsayılmıştır.

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (3.1)$$

N_0 : Başlangıç spor sayısı (kob/mL)

N : Uygulanan işlem sonucu spor sayısı (kob/mL)

D : 1 logaritma birimlik azalma için (%90 azalma) gerekli süre (saat)

t : zaman (saat)

Weibull Model

Sporisidal aktivitenin Weibull ile modellenmesi Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, 2010)'e eklenen GInaFiT Geeraerd ve Van Impe inaktivasyon programı versiyon 1.7 (Geeraerd vd., 2005)'ye göre yapılmıştır.

Bu model bir popülasyondaki hücrelerin ve sporların farklı dirençlere sahip olduğunu ve bir hayatta kalma eğrisinin sadece öldürücü ajanların dağılımının kümülatif biçimi olduğunu varsaymaktadır.

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^\beta \quad (3.2)$$

N_0 : Başlangıç spor sayısı (kob/mL)

N : Uygulanan işlem sonucu spor sayısı (kob/mL)

δ : Sporların bir logaritma birimlik azalması için gerekli süre (saat)

β : Eğrinin şeklini ifade eder. $\beta < 1$ (konveks kurve), $\beta = 1$ (lineer kurve), $\beta > 1$ (konkav kurve)

Eğer $\beta > 1$ ise kalan sporların uygulanan işleme duyarlı olduğunu ifade etmektedir. $\beta < 1$ ise kalan sporların dirence sahip olduğunu, strese uyum sağladığını ve dolayısıyla daha az inhibe olma olasılığına sahip olduğunu ifade etmektedir. $\beta = 1$ ise, tüm spor popülasyonunun eşit duyarlılığını ifade etmektedir.

Modifiye Gompertz Eşitliği

Zwietering vd., (1990) tarafından geliştirilen bu model excel tabanlı ÖK-BUZ GRoFiT programında yapılmıştır (Öksüz ve Buzrul, 2021). Modelin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$\log_{10}N(t): \log_{10}N_0 + (\log_{10}N_{\max} - \log_{10}N_0) \cdot \exp\{-\exp[\mu_{\max}^{e/2.303} / \log_{10}N_{\max} - \log_{10}N_0 \cdot (\lambda - t) + 1]\} \quad (3.3)$$

N_0 : Başlangıç spor sayısı (kob/mL)

N : Uygulanan işlem sonucu spor sayısı (kob/mL)

μ_{\max} : Azami özgül büyüme hızı (1/saat)

λ : Lag fazı süresi (saat)

t : zaman (saat)

\exp : Euler sayısı (2,7182)

Modellerin Karşılaştırılması

Tahminlemede kullanılan modellerin uygunluğu ortalama karakök hata (RMSE) ve korelasyon katsayısı (R^2) değerine göre değerlendirilmiştir. Daha düşük hata oranına sahip model, tahminlemede daha doğru olarak yorumlanırken, daha yüksek bir R^2 değeri verilerin seçilen model ile daha iyi tanımlandığını ifade etmektedir (Jaiswal ve Jaiswal, 2015).

3.4.7. Tarçın Esansiyel Yağı- Asetik Asit Kombinasyonunun Sinerjistik Aktivitesinin ve MİK Değerinin Belirlenmesi

Test edilen yağlar içinde en etkin antibakteriyel aktivite gösteren tarçın esansiyel yağının kuvvetli aroması ve yağın yapısından dolayı çalışmanın devamındaki bölümlerde kullanılabilirliğinin artırılması amacıyla asetik asit ile kombine edilmiştir. Asetik asit ve tarçın yağı kombinasyonunun *C. difficile* ATCC 1870 üzerindeki sinerjisi 3.3.6'da anlatıldığı gibi dama tahtası yöntemi ile belirlenmiştir. 96 kuyucuklu mikroplakta seri dilüsyonları hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki asetik asit ve tarçın yağı karışımı bulunan kuyucuklara spor solüsyonundan 50 µL ilave edilmiştir. 35-36°C'de 48 saat anaerobik inkübasyonun ardından en küçük FİK değeri belirlenmiştir (Shahverdi vd., 2007).

Kombinasyonun MİK değeri ise 3.4.4’de anlatıldığı şekilde mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir (CLSI, 2012).

3.5. Araştırma 4. Yıkamanın Maruldaki *C. difficile* Sporları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

3.5.1. Materyal

Marulların yıkanmasında tarçın esansiyel yağı (TEY) ve asetik asit (AA) kombinasyonunun MİK, 2xMİK, 4xMİK konsantrasyonları ile sodyum hipoklorit (NaOCl)’in 50, 100 ve 200 ppm konsantrasyonlarındaki sulu çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak çeşme suyu kullanılmıştır. Marullara toksinojenik bir suş olan *C. difficile* ATCC 1870 inoküle edilmiştir.

3.5.2. Marul İnokülasyonu

İnokülasyondan önce marulların toplam yükünü uzaklaştırmak amacıyla 200 ppm NaOCl ile 15 dk dezenfeksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu konsantrasyon ve süre ile dezenfeksiyon uygulaması marullardaki anaerob ve aerob mikrobiyal yükün tamamını inhibe etmiştir. Durulamanın ardından marullar 30 dk kurumaya bırakılmıştır. 6 log kob/mL *C. difficile* ATCC 1870 sporu içeren 250 mL solüsyona 25 gram marul 10 dk daldırılmıştır. Marulların kuruması ve mikroorganizmanın marul yüzeyine tutunması için laminar güvenlik kabininde 2 saat bekletilmiştir.

3.5.3. Marullara İnoküle Edilen *C. difficile*’nin Geri Kazanılması

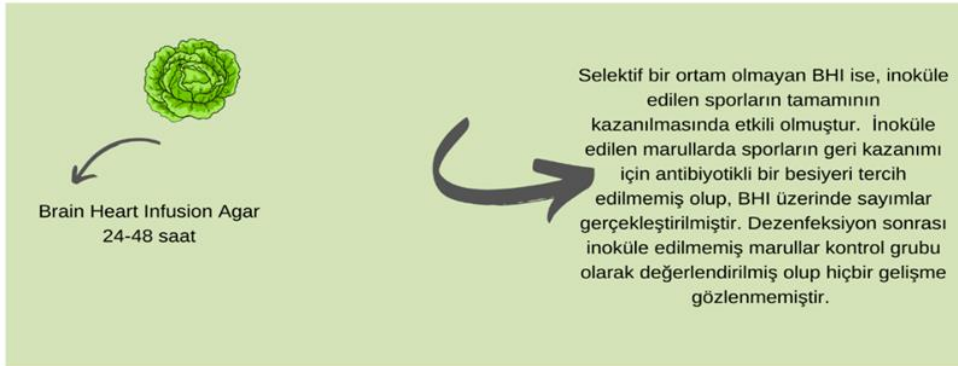
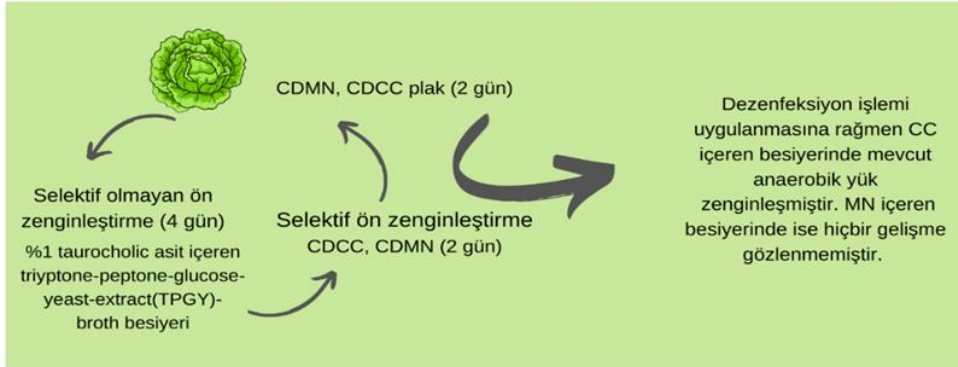
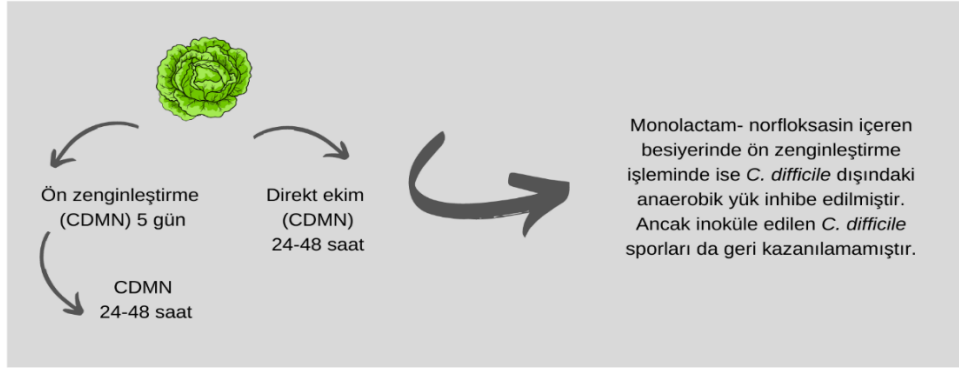
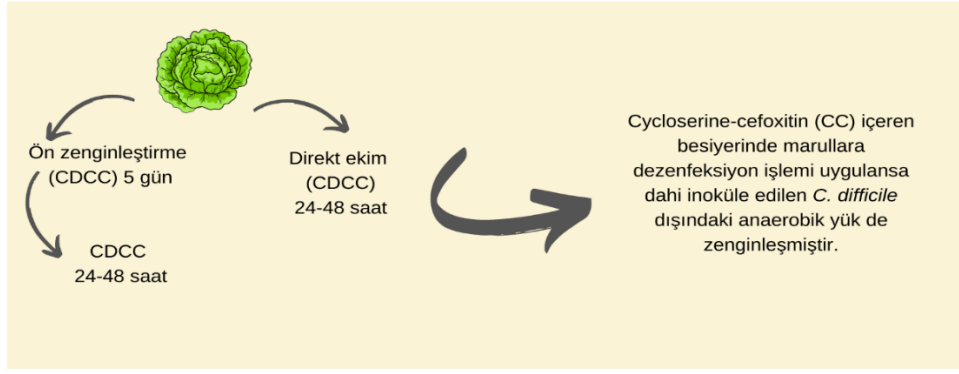
İnoküle edilen sporun geri kazanılmasında uygun besiyeri ve yöntemin belirlenmesi için 3 farklı çalışma uygulanmıştır. İnoküle edilen marullardan hem direkt ekim yapılmış hem de ön zenginleştirme işlemleri uygulanmıştır. Marullara inoküle edilen *C. difficile*’nin geri kazanılması çalışmaları Şekil 16’da gösterilmiştir.

1.Calışma: Sporların geri kazanılmasında Flock (2017)’nin yöntemi uygulandığında cycloserine-cefoxitin içeren *C. difficile* Agar base (CDCC) ile ön zenginleştirilen marullarda dezenfeksiyon işlemi uygulansa dahi inoküle edilen *C. difficile* dışındaki anaerobik yük de

zenginleşmiştir ve koloni sayısı sayılabilir seviyenin üstüne çıkmıştır (>300 kob/g). Monolaktam- norfloksasin içeren *C. difficile* Agar Base (CDMN) içeren besiyerinde ön zenginleştirme işleminde ise *C. difficile* dışındaki anaerobik yük inhibe edilmiştir. Ancak inoküle edilen *C. difficile* sporlar da geri kazanılamamıştır.

2.Çalışma: Heise vd., (2021) ve Scholtzek vd., (2022)'in yöntemi uygulandığında ise, *C. difficile* ile inoküle edilen 25 gram marul örneği 225 mL %0,1 sodyum taurokolat içeren tripton (50g/L), et ekstraktı (5g/L), maya ekstraktı (20g/L) (TPGYT) besiyerinde 2-4 gün anaerobik koşullarda selektif olmayan ön zenginleştirmeye bırakılmıştır. Ardından monolaktam-norfloksasin eklenen *C. difficile* Agar Base besiyerinde 2 gün selektif ön zenginleştirme uygulanmıştır. Bu yöntem ek olarak monolaktam-norfloksasin yerine sikloserin-sefoksitin antibiyotikleri de denenmiş ancak MN kullanılan besiyerinde sporlar geri kazanılamazken CC kullanılan besiyerinde dezenfeksiyon işlemi uygulanmasına rağmen mevcut anaerobik yük de zenginleşmiştir. Petride *C. difficile* tipik kolonisi dışında koloniler de gözlenmiş olup koloni sayısı sayılabilir seviyenin üstüne çıkmıştır (>300 kob/g).

3.Çalışma: Selektif bir ortam olmayan BHI ise, inoküle edilen sporların tamamının kazanılmasında etkili olmuştur. İnokülasyon öncesi marullara uygulanan dezenfeksiyon işleminin anaerob ve aerob mikrobiyal yükü azaltmadaki etkisi BHI plaklarda kontrol edilmiş olup dezenfeksiyon işlemi mikrobiyal yükün tamamını inhibe etmiştir. Benzer şekilde (Sorg ve Dineen, 2009)'un yöntemiyle spor solüsyonunun eldesinde de BHI Agar tercih edilmiş olup sporların tamamının geri kazanılmasını sağlamıştır. Sonuç olarak inoküle edilen marullarda sporların geri kazanımı için antibiyotikli bir besiyeri tercih edilmemiş olup, BHI üzerinde sayımlar gerçekleştirilmiştir. 25 gram marul örneği PBS içinde stomacher cihazı ile 30 sn parçalanmıştır. Seri dilüsyonlar halinde BHI Agar'a ekim yapılmıştır. 35-36 °C'de 24 saat sonunda petride oluşan koloniler sayılmıştır. Dezenfeksiyon sonrası inokülasyon yapılmayan marullar da aynı şekilde analize alınmış ve kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İnokülasyon yapılan fakat yıkama işlemi uygulanmayan marullar tutunma seviyesinin kontrolü için değerlendirilmiştir. Yıkama işleminin kontrol grubu olarak steril içme suyu kullanılmıştır.



Şekil 16: İnoküle edilen *C. difficile*'nin geri kazanılması çalışmaları

3.5.4. Marulların Yıkanması

2 saat tutunmanın ardından marullar tarçın yağı-asetik asit yıkama solüsyonunun MİK, 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında ve 50, 100 ve 200 ppm NaOCl içeren sularda ve steril çeşme suyunda 5 ve 15 dk yıkanmıştır (Şekil 17).

3.5.5. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Yükünün Belirlenmesi

Başlangıçtaki dezenfeksiyon işlemi uygulanmadan marullar direkt tarçın yağı-asetik asit yıkama solüsyonunun MİK, 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında ve 50, 100, 200 ppm NaOCl içeren sularda 5 ve 15 dk yıkanmış ve uygun desimal dilüsyonlardan toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) yükünün belirlenmesi için Trypton Soy Agar (TSA, Merck, Almanya)'a ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 30-300 arasında koloni olan petriyerlerde sayım yapılmıştır (Uhlig vd., 2017).

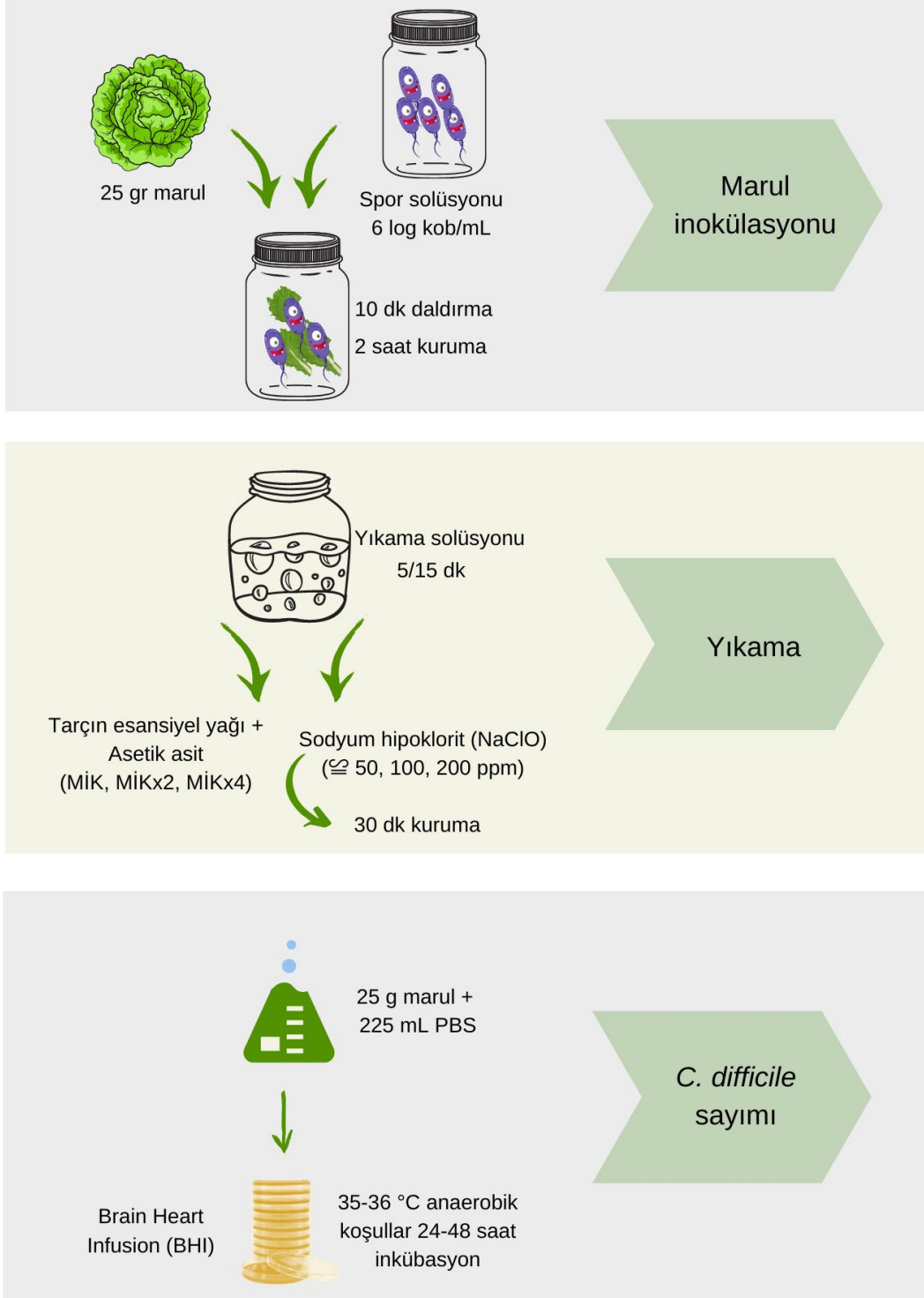
3.5.6. Enterobacterales Yükünün Belirlenmesi

Başlangıçtaki dezenfeksiyon işlemi uygulanmadan marullar direkt tarçın yağı-asetik asit yıkama solüsyonunun MİK, 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında ve 50, 100 ve 200 ppm NaOCl içeren sularda 5 ve 15 dk yıkanmış ve uygun desimal dilüsyonlardan Enterobacterales yükünün belirlenmesi için Violet Red Bile Glucose (VRBG, Merck, Almanya) Agar besiyerine çift tabaka ekim yöntemine göre inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan petriyerler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 30-300 arası koloni gözlenen petriyerlerden tipik mukoid pembe koloniler alınarak doğrulama testleri yapılmış ve Enterobacterales sayıları hesaplanmıştır (Oliveira vd., 2012).

3.5.7. Kontrol Marul Örneklerinde Fiziksel ve Kimyasal Analizler

İnokülasyon yapılmayan marul örneklerinde yıkama işlemlerinin marul örneklerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi incelenmiştir. Yıkama işlemleri uygulanmayan marul örnekleri kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Hem yıkanan hem de yıkanmayan marul örneklerinin % L, a, b değerleri renk ölçüm cihazı Konica Minolta (CR-400, Japonya)

ile (Caner ve Aday, 2009), tekstür özellikleri, Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, England) (Jaiswal vd., 2012) ile belirlenmiş, ayrıca pH, suda çözünür kuru madde (SÇKM), (Cemeroğlu, 2013), toplam fenolik madde (Liu vd., 2007; Nikzad ve Parastar, 2021) analizleri yapılmıştır.



Şekil 17: İnoküle edilen marulların yıkanmasının iş-akış şeması

Renk Analizi

Yıkama işlemi uygulanan ve uygulanmayan marul örnekleri ile modifiye atmosfer paketlenen marullarda depolamanın marulların rengine olan etkisi renk ölçüm cihazı (Konica Minolta, CR-400, Japonya) ile belirlenmiştir (Caner ve Aday, 2009). L değeri parlaklığı ifade eder ve 0 (siyah)-100 (beyaz) arasında değişmektedir. (-) a değeri yeşillik seviyesini ölçerken (+a) değeri kırmızılık seviyesini ifade etmektedir. (-) b değeri mavilik seviyesini ölçerken, (+) b ise sarılık seviyesini belirtmektedir. Her örnekte 6 okuma yapılmıştır. İşlem uygulanmayan marulların renkleri kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Tekstür Analizi

Tekstür özellikleri Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, England) ile belirlenmiştir. 15 gram marul alınarak silindirik şeklinde sarılmış ve tablaya yerleştirilmiştir (Şekil 18). Warner bratzler blade (v) bıçak yardımıyla 60mm/sn hızla marullar kesilmiş ve en yüksek uygulanan (N) belirlenmiştir (Jaiswal vd., 2012).



Şekil 18. Marulların tekstür özelliğinin belirlenmesi

pH

10 g marul örneği blenderda homojenize edilmiş ve kaba filtre kağından geçirildikten sonra pH değerleri pH metre'de (Sartorius, Almanya) ölçölmüştür (Cemeroğlu, 2013).

Suda Çözünür Kuru Madde (SÇKM)

Blenderda homojenize edilen ve kaba filtre kağından geçirilen marulların (şekil 19) suda çözünür kuru maddeleri dijital refraktometre (Hanna HI 96800, Amerika) ile ölçölmüştür (Cemeroğlu, 2013).



şekil 19. Marulların SÇKM değerlerinin belirlenmesi

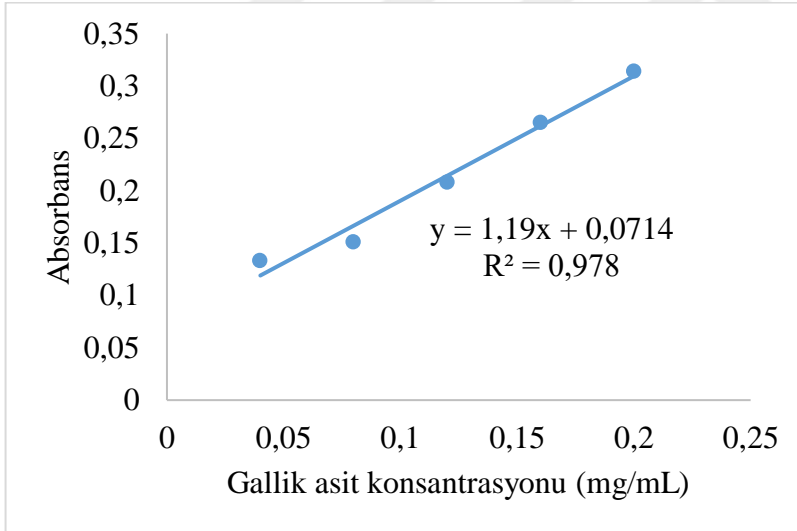
Ağırlık Kaybı

Modifiye atmosfer paketlenme sonrası her uygulama için rastgele seçilen ikişer paket depolamanın 1, 3, 5, 7 ve 10. günlerinde tartılmış ve ağırlık kaybı ölçölmüştür (Tiryaki, 2021).

Toplam Fenolik Madde

Yıkama solüsyonları ile yıkanan marulların toplam fenolik içerikleri Liu vd., (2007) ve Nikzad ve Parastar (2021)'nin yöntemleri modifiye edilerek yapılmıştır. Fenolik maddelerin ekstraksiyonu için marullardan 1 gram alınarak 10 mL %80'lik etanol-su karışımında oda sıcaklığında 15 saat bekletilmiştir. 100 µL ekstrakt, 6 mL distile su, 500 µL folin reaktifi (damıtık su ile 1:5 oranında seyreltilmiş) ve 1.5 mL Na₂CO₃ (20mg/mL) vortekslenmiş ve 2 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 3800 g'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve 765 nm'de okuma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar gallik asit eşdeğeri üzerinden mg GA/gram şeklinde ifade edilmiştir.

Gallik asit kurvesinin oluşturulması amacıyla 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2 mg/mL konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri etanol ile hazırlanmış ve yukarıda anlatıldığı şekilde absorbsanları okunmuştur. Konsantrasyona karşılık okunan absorbsan değerleri ile gallik asit standart kurvesi oluşturulmuştur (Şekil 20).



Şekil 20. Gallik asit standart eğrisi

3.6. Araştırma 5. Yıkanan Marulların Modifiye Atmosfer Paketleme ile Depolanmasının *C. difficile* Sporları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

3.6.1. Materyal

Marullara *C. difficile* ATCC 1870 inoküle edilmiştir. Modifiye atmosfer paketler için Pet/EVOH/PP antifog (Koroza Ambalaj Co.R&D, Türkiye) film katmanlı PP (12x20x7 cm) özel kaplar kullanılmıştır.

3.6.2. Marul İnokülasyonu

Marullara *C. difficile* ATCC 1870 inokülasyonu bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.6.3. Marulların Yıkaması

4. çalışmada yıkama solüsyonları farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde uygulanmış ve hem mikrobiyal inaktivasyonun en iyi sağlandığı hem de marulun fiziksel ve kimyasal özelliklerinin en fazla korunduğu konsantrasyon ve süre parametreleri 5. çalışma için seçilmiştir. Marullar 2xMİK konsantrasyondaki TEY-AA kombinasyonu ile 5 dk ve 50 ppm konsantrasyondaki NaOCl ile 15 dk daldırma yöntemi ile yıkamıştır. Kontrol grubu olarak steril çeşme suyu ile 5 dk yıkanan marullar değerlendirilmiştir. Yıkama uygulamaları sonunda marullar laminar güvenlik kabininde 30 dk kurumaya bırakılmıştır.

3.6.4. Modifiye Atmosfer Paketleme

Yıkanan marullar her pakette 25 gram olacak şekilde ReePack ReTray 25TC MAP APACK (Seriate, İtalya) cihazı ile modifiye atmosfer paketlenmiştir (Şekil 21). Yıkama işleminden sonra biyogüvenlik kabininde kurutulan marullar steril maşalar ile Pet EVOH PP film katmanlı polipropilen kaplara alınarak %2 CO₂, %5 O₂ ve %93 N₂ varlığında 4 ve 10°C’de 10 gün depolanmıştır. Depolama günlerindeki gaz kompozisyonundaki değişim marul ambalajı açılmadan önce gaz analizörü (AGC Instruments, map-pak combi, İrlanda) iğnesi batırılarak ölçülmüştür (Şekil 22). İnoküle edilen tüm marullar daha sonra otoklav ile bertaraf edilmiştir. Modifiye atmosfer paketlenen marulların iş-akış şeması Şekil 23’de

verilmiştir.

3.6.5. *C. difficile* Sayımı

Depolamanın 1, 3, 5, 7 ve 10. günlerinde bölüm 3.5.4.'de belirtilen yöntemle göre *C. difficile* sayımı yapılmıştır (Sorg ve Dineen, 2009). Paketlerden 25 gram marul örneği alınarak 225 mL fosfat tamponlu serum fizyolojik su (PBS) içinde stomacher cihazı ile 30 sn homojenize edilmiştir. Seri dilüsyonlar halinde BHI agar'a ekim yapılmıştır. 35-36 °C'de 24 saat sonunda petride oluşan koloniler sayılmıştır. Analizler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.6. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri ve Enterobacterales sayımı

C. difficile inoküle edilmeyen ve anaerobik yükün uzaklaşması amacıyla dezenfekte edilmeyen marullarda depolamaya bağlı olarak toplam aerobik mezofilik bakteri ve Enterobacterales yükü araştırılmıştır. Bölüm 3.6.3'de belirtilen parametreler ile yıkanan marullar güvenlik kabini kurduktan sonra modifiye atmosfer paketlenmiştir. Depolamanın 1, 3, 5, 7 ve 10. günlerinde paketlerden 10 g alınarak TAMB için TSA'ya (Uhlig vd., 2017) Enterobacterales için ise VRBG Agar'a seri dilüsyonlar halinde inokülasyon yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından petrilerdeki koloniler sayılmıştır (Oliveira vd., 2012).



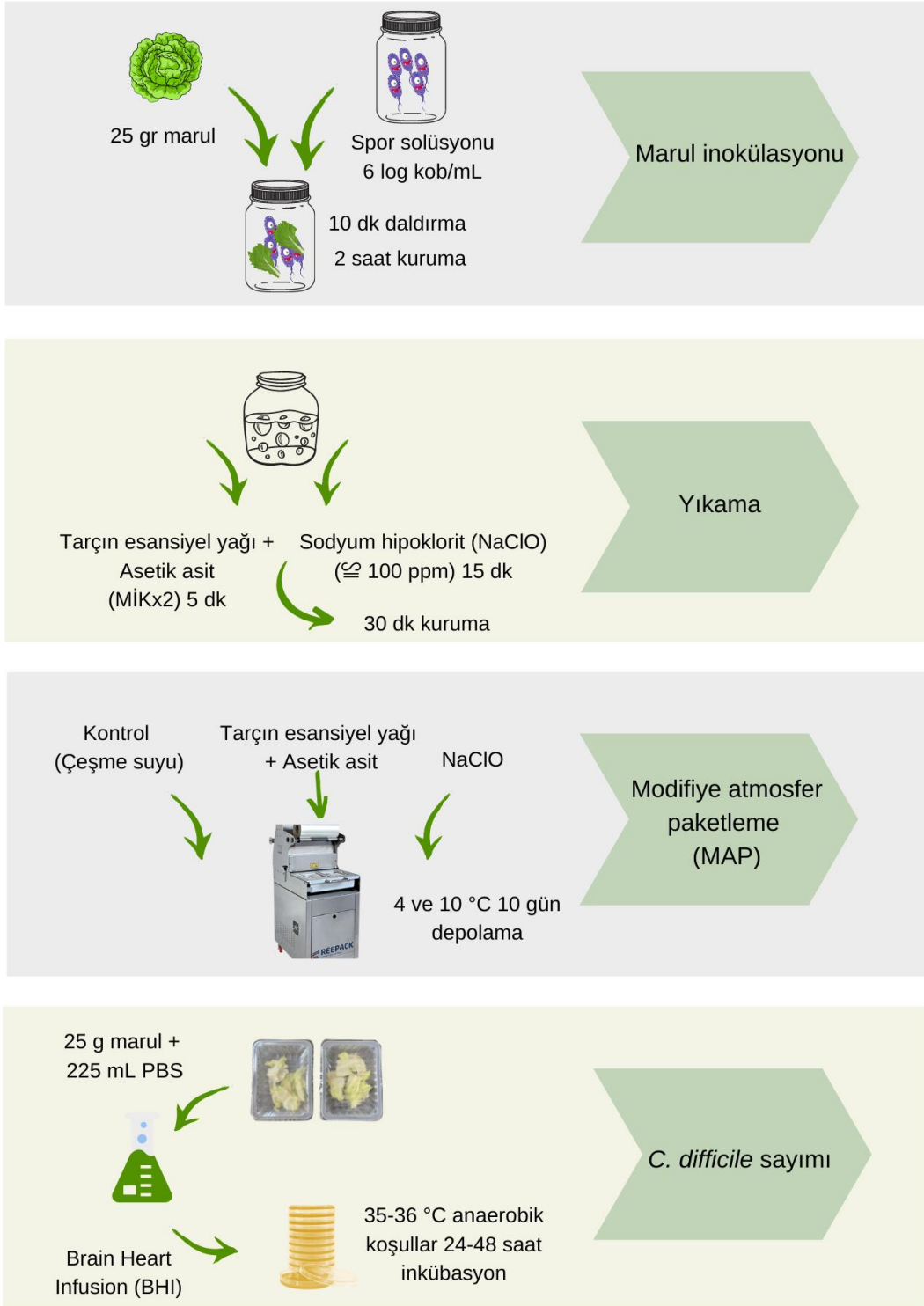
Şekil 21. Marulların modifiye atmosfer paketlenmesi



Şekil 22. Paket içindeki gaz kompozisyonunun ölçülmesi

3.6.7. Modifiye Atmosfer Paketlenen Marulların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

C. difficile inoküle edilmemiş kontrol örneklerinde depolamanın 1, 3, 5, 7 ve 10. günlerinde renk (Caner ve Aday, 2009), tekstür (Jaiswal vd., 2012), pH (Cemeroğlu, 2013), suda çözünür kuru madde (Cemeroğlu, 2013), ağırlık kaybı, toplam fenolik madde (Liu vd., 2007; Nikzad ve Parastar, 2021) analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 23. Modifiye atmosfer paketlenen marulların iş-akış şeması

3.7. İstatistiksel Analizler

Analizlerin istatistiksel analizi için IBM SPSS (Versiyon 21) ve Minitab (versiyon 17) paket programları kullanılmıştır. Analizler 3 tekerrür 2 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. MİK değerleri ve inhibisyon zonları arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir. Antibiyofilm analizinde yağlar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile ve antibiyofilm analizinin istatistik değerlendirmesi Paired- Samples T test ile yapılmıştır. Yıkama solüsyonlarının ve modifiye atmosfer paketlenen örneklerin uygulanan işlemlere olan etkisinin karşılaştırılması ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. $P \leq 0.05$ olduğu durumlarda uygulamalar arasındaki farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Araştırma 1. Marullarda *C. difficile* Varlığı

4.1.1. Marullardan Elde Edilen İzolatlar ve Antibiyotik Direnç Profilleri

Çalışmamızda 7 farklı ilden (Aydın, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Düzce, İzmir, Manisa) temin edilen 107 adet marul örneğinin 72'sinde (%72, 89) sikloserin-sefoksitin katkılı *C. difficile* Agar base (CDCC) besiyerinden izolat elde edilmiştir. CDCC besiyerinde at gübresi kokusuna sahip, düzensiz şekilli, gri ve opak görünümde olan koloniler şüpheli *C. difficile* izolatı kabul edilmiş ve CDCC'den toplamda 101 izolat elde edilmiştir. Seçiciliğin artırılması amacıyla izolatlar ChromID *C. difficile* Agar kromajenik besiyerine çizilmiş ve 35-36°C'de 24 saat anaerobik koşullarda inkübasyonun ardından 42 izolat siyah koloni meydana getirmiştir (Tablo 6). 42 İzolat BHI'ya stok alınmış ve daha sonra tekrar aktifleştirilerek izolatlar Gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonunda izolatların %7,14'ü (3/42) Gram (+) ve çubuk, %92,85'i (39/42) ise kok olarak tespit edilmiştir. Çubuk görünümde olan izolatların 1 tanesi Aydın, diğer 2 tanesi ise Balıkesir ilinden temin edilen marullardan elde edilmiştir.

Tablo 6
Marullardan elde edile izolatlar

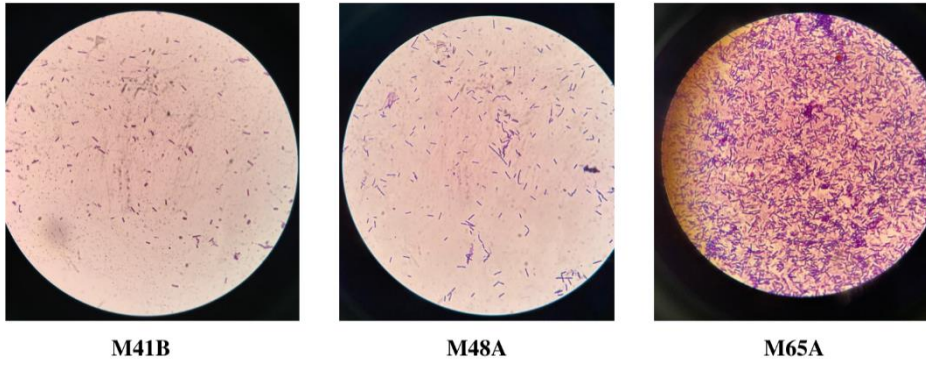
Temin edildiği bölge	İzolat alınan örnek sayısı/örnek sayısı	İzolat sayısı	
		CDCC	ChromID
Aydın	6/6	9	5
Balıkesir	14/23	23	14
Bursa	3/3	6	3
Çanakkale	20/37	26	12
Düzce	4/4	4	2
İzmir	27/30	37	4
Manisa	4/4	4	1
Toplam	78/107	101	42

Gram (+) ve çubuk olan 3 izolat MALDI-TOF MS ve API 32A ile tanımlanmıştır. Gram boyama sonucunda Gram (+) belirlenen izolatlar MALDI-TOF MS sonuçlarına göre Gram (-) ve çubuk şeklinde olan *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter cancerogenus* olarak tanımlanmışlardır. Bu sonuçlar hem besiyerinin seçiciliği hem de MALDI-TOF MS yönteminin anaerobları tanımlamada yeterliliği açısından düşündürücü olmuştur. İzolatların mikroskop görüntüleri şekil 24 'de gösterilmiştir. Diğer taraftan bu üç izolat API 32A ile de tanımlanmış olup 2 tanesi *C. perfringens* ve 1 tanesi *Actinomyces naeslundii* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızdaki örneklerin hiçbirinden *C. difficile* izole edilmemiştir.

Tablo 7

İzolatların MALDI-TOF MS ve API 32A ile tanımlanması

İzolat numarası	Temin edildiği il	MALDI-TOF MS	API 32A
M41B	Balıkesir	<i>E. cancerogenus</i>	<i>C. perfringens</i>
M48A	Aydın	<i>E. cloacae</i>	<i>C. perfringens</i>
M65A	Balıkesir	<i>E. cloacae</i>	<i>A. naeslundii</i>



Şekil 24. İzolatların mikroskop görüntüleri

Hem MALDI-TOF MS'in hem de API 32A'nın anaerob bakterileri tanımlamada eksikleri olduğunu ifade eden çalışmalar mevcuttur. API 32 A ile *Clostridium difficile*, *C. bifermentans*, *C. sordellii* ve *C. perfringens* suşlarından oluşan elli beş klinik izolatın tanımlandığı bir çalışmada (Fontana vd., 1995), toplam 55 izolatın yalnızca 10 tanesinin doğru şekilde tanımlandığı ve doğru tanımlanan bu izolatların birinin *C. difficile*, ikisinin *C. bifermentans*, ikisinin *C. sordellii*, ve ikisinin *C. perfringens* olarak doğrulanabildiği bildirilmiştir. Mory ve vd., (2009) standart suşlar üzerinde yaptıkları çalışmada *C.*

difficile'yi VİTEK ile *C. sporogenes* olarak tanımlarken, DNA sekanslama ile *C. difficile* olarak tanımlamışlardır.

C. difficile'nin tanımlanmasında enzim sistemlerine dayalı yöntemler yetersiz kalmaktadır. MALDI-TOF MS ve RAPID ID 32 A sistemleriyle tanımlanan izolatların DNA sekanslanması ile doğrulanması gerekmektedir. Moleküler düzeydeki çalışmaların yüksek maliyete sahip olması nedeniyle izolatların moleküler olarak doğrulanması aşaması bu tez kapsamında gerçekleştirilememiştir.

Diğer taraftan *C. difficile*'nin gıdalarda bulunma sıklığının düşük olduğu ve izolasyonda standart yöntemler olmadığı gibi mevcut yöntemler gıdalardan ziyade dışkı örnekleri için optimize edilmiştir. Sikloserin-sefoksitin ve monolaktam- norfloksasin gibi seçici ajanların *C. difficile*'nin geri kazanılmasında olumsuz etkisi olduğuna ve yalnızca gıda örneklerinden dirençli *C. difficile* izolatlarının geri kazanılmasına olanak sağladığı ifade edilmektedir (Barbosa vd., 2020). Bu tezin ileriki bölümlerinde inokülasyon çalışmalarında da gözlemimiz aynı şekilde olmuştur. Ayrıca seçici ajanlar gibi faktörlerin yanı sıra örnek miktarı, seyreltme faktörleri, inkübasyon süreleri gibi farklılıklar da gıdalardan *C. difficile*'nin geri kazanımını etkileyebileceği belirtilmektedir (Barbosa vd., 2020).

Marullarda (Bakri vd., 2009; Han vd., 2018), salatalarda (Metcalf vd., 2010; Eckert vd., 2013), patates, soğan, zencefil ve pancarda (Lim vd., 2018; Tkalec vd., 2019) *C. difficile* varlığını rapor eden çalışmalar mevcuttur.

Metcalf vd., (2010) havuç ve zencefilden elde ettikleri 2 *C. difficile* izolatının klindamisine dirençli, metronidazol ve vankomisine duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Zidaric ve Rupnik (2012) aralarında ChromID besiyerinin de bulunduğu farklı besiyerlerinde *C. difficile* varlığını araştırmış ve 8 sebze örneğinin hiçbirinde *C. difficile*'ye rastlamamışlardır. Rodriguez-Palacios vd., (2014) marul ve biberden elde ettikleri 3 izolatın moksifloksasin ve klindamisine dirençli olduğunu ifade etmişlerdir. Han vd., (2018) marullardan %13,8 oranında (41/297) *C. difficile* izole etmişler ve elde ettikleri 44 izolatın tamamının metronidazol, eritromisin ve vankomisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Usui vd. (2020) 242 sebze örneğinde *C. difficile* varlığını araştırmışlar ve kök sebzelerin

%4,7'sinde *C. difficile* saptamışlardır. Yapraklı sebzelerin hiçbirinde ise etkenin varlığını bildirmemişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen izolatların %4,14 (2/42)'ü *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır. Diğer API 32A ile tanımlanan izolat ise *Actinomyces naeslundii* olarak tanımlanmıştır. 38 marul, 12 ıspanak ve 101 karışık salatada yapılan çalışmada (Santos vd., 2012), örneklerin hiçbirinde *C. perfringens* saptanmamıştır. 2009 yılında rapor edilen bir gıda zehirlenmesinde (Der vd., 2013), etkenin *C. perfringens* olduğu ve karışık lahana ve salatalarda sırasıyla 10^7 kob/g ve 10^9 kob/g spor varlığı saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca Ghourchian vd., (2020) aralarında dereotu, maydanoz, kişniş, tarhun, nane ve karışık salatanın olduğu sebzelerde %9,3 (13/140) *C. perfringens* saptamıştır.

EUCAST (2022) standardında vankomisin, klindamisin ve metronidazol antibiyotikleri için belirlenen MİK değerleri *C. perfringens* için sırasıyla 2, 0,25 ve 4 mg/L olarak verilmiştir. Bu değerlerin altındaki MİK değeri için izolatlar duyarlı, üstündeki MİK değerleri için ise dirençli olarak değerlendirilmiştir. API 32A ile *C. perfringens* olduğu tanımlanan 2 izolatın antibiyotik direnç profili E test ile belirlenmiştir. M48A numaralı izolatta vankomisin ve metronidazolde zon oluşumu gözlenmemiş olup klindamisin için MİK değeri $2\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bu izolat test edilen antibiyotiklere karşı direnç göstermiştir. M41B numaralı izolatta ise, vankomisin ve klindamisin için belirlenen MİK değeri sırasıyla 2 ve $6\mu\text{g/mL}$ olmuştur. Metronidazolde ise zon oluşumu gözlenmemiştir. Her iki izolat da test edilen antibiyotiklere karşı direnç göstermiştir.

4.2. Araştırma 2. Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile *C. difficile* Vejetatif Formunun Kontrolü

4.2.1. Agar Kuyucuk ve Disk Difüzyon İnhibisyon Zonları

Tezin bu bölümünde doğal antimikrobiyal maddelerin *C. difficile*, *C. sporogenes* ve *C. perfringens* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi agar kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Etkili bulunan maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları mikrodilüsyon ile belirlenmiş ve düşük MİK değerine sahip maddelerin uçucu bileşenleri GC-FID-MS ile analiz edilmiştir.

C. difficile'nin geleneksel antibiyotik tedavisine direnç kazanması, kontrolünde yeni stratejilerin geliştirilmesi ihtiyacını meydana getirmektedir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal antimikrobiyal maddeler, patojenlerin kontrolünde yenilikçi ve sürdürülebilir bir seçenek olarak belirtilmektedir (Tortajada-girbes vd., 2021).

Agar kuyucuk yöntemi aktif maddelerin aktibakteriyel aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Balouiri vd., 2016). Standart bir ölçüm için kuyucukların 4 mm derinlik ve 8 mm çapta olması önerilmektedir (Aytar vd., 2019).

Antibakteriyel aktivitesi agar kuyucuk yöntemi ile test edilen 23 doğal maddenin 19'unda inhibisyon zonu gözlenmiştir (Tablo 8). Zonlar 11,74- 38,83 mm arasında tespit edilmiştir. Tarçın ve çay ağacı yağları tüm suşlara karşı en yüksek aktiviteye sahip olan doğal maddeler olmuştur. Tarçın yağında en yüksek antibakteriyel aktivite 38,83±2,08 mm zon ile *C. difficile* ATCC 9689'a karşı gözlenmiştir (Şekil 25, 26, 27). Roshan vd., (2017) tarçın tozunun (%20; v/v) *C. difficile* ATCC 700057'ye karşı agar kuyucuk yöntemi ile 20,4±0,5 mm zon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise *C. difficile* ATCC 700057'ye karşı tarçın yağı 37,42± 1,24 mm zon oluşturmuştur. Bu farklılığın antimikrobiyal etkiden sorumlu maddelerin farklı konsantrasyonlarda olmasından ve kullanılan farklı formlardaki antimikrobiyal maddelerin farklı difüzyon özelliği göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

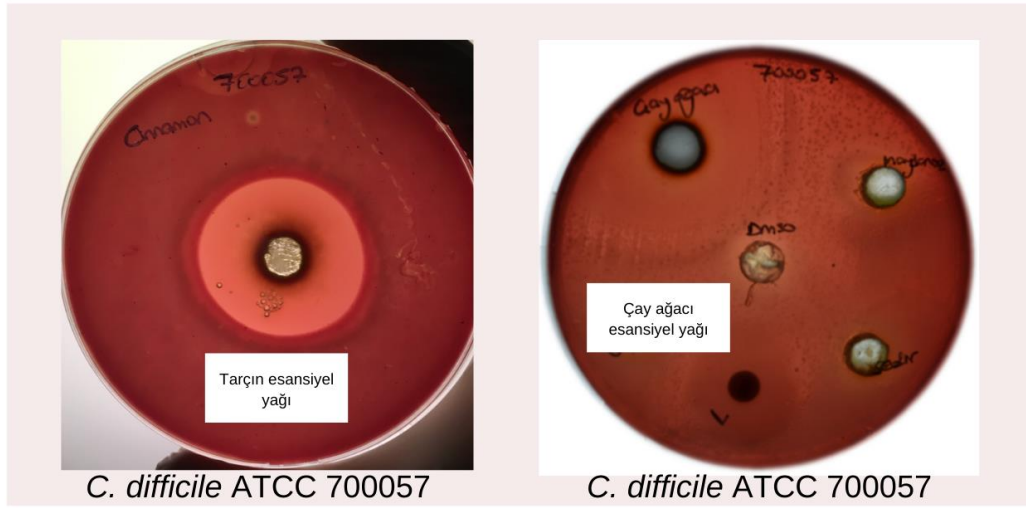
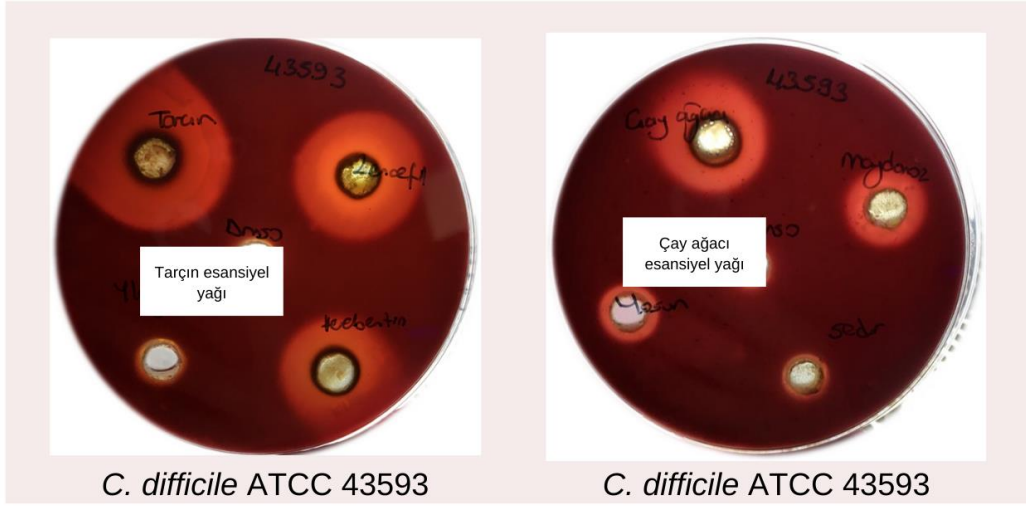
Çay ağacı yağı ise en yüksek inhibisyon zonunu (37,35±0,01 mm) *C. sporogenes* ATCC 11437'ye karşı oluşturmuştur. En düşük zon (11,74±1,27) hardal tohumu yağında *C. difficile* ATCC 9689'a karşı ölçülmüştür. Sarımsak, acıbadem, ısırgan tohumu yağlarında ve propolis ekstraktında inhibisyon zonu gözlenmemiştir (<8mm). *C. perfringens* ve *C. sporogenes* test edilen antimikrobiyal maddelere karşı *C. difficile* suşlarından daha fazla direnç göstermiştir. *C. perfringens* ATCC 12915'e karşı en yüksek zon çay ağacı ve limon yağında gözlenmiştir. Limon yağı sadece *C. perfringens* ve *C. sporogenes*'e karşı etkili olmuştur. Kavun yağı sadece *C. difficile* ATCC 9689'a karşı 15,32 mm zon sergilemesine karşın *C. difficile* ATCC 700057'ye karşı temiz bir zon oluşturmasa da gelişimi zayıflatmıştır. Kimyon yağı ise sadece *C. perfringens*'e karşı antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir.

Tablo 8

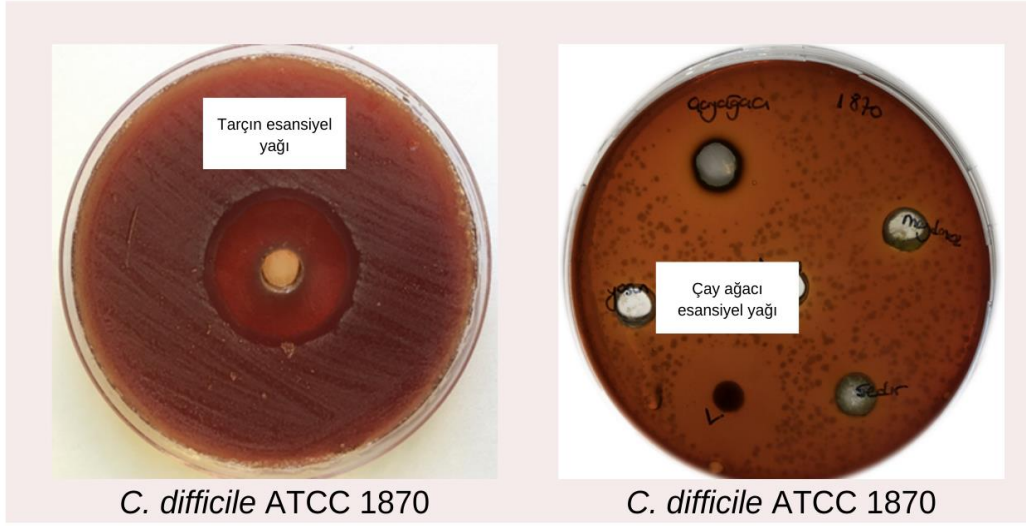
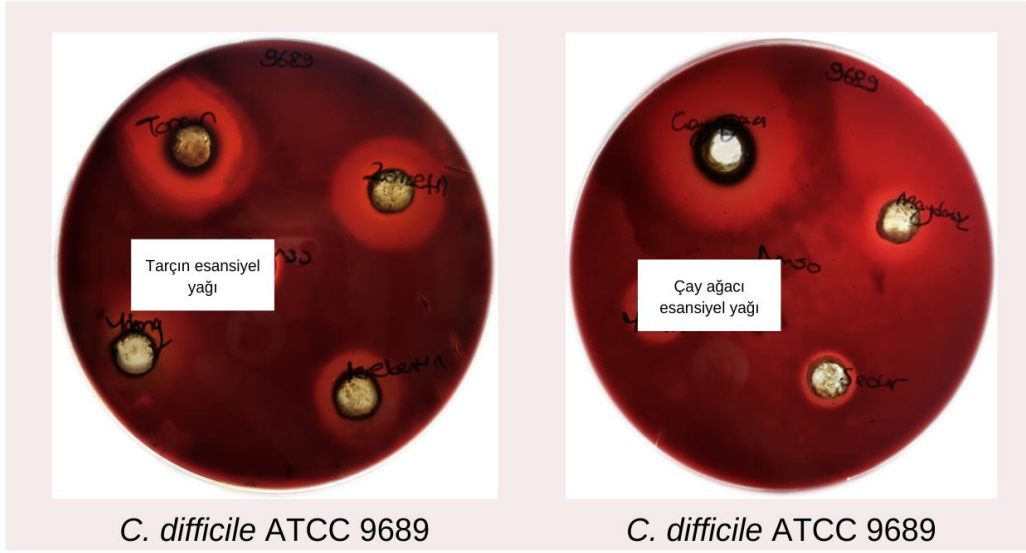
Doğal maddelerin agar kuyucuk inhibisyon zonları (mm)

	<i>C.difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
Acıbadem	<8*	<8	<8	<8	<8	<8
Ardıç	24,32±0,55	16,18±0,49	28,28±0,09	19,16±0,86	<8	<8
Çam- terebentin	19,88±1,13	22,79±0,72	18,95±0,73	21,20±0,94	13,95±1,50	<8
Çay ağacı	23,38±0,12	24,95±0,50	36,62±0,30	20,50±0,64	37,35±0,01	24,64±0,69
Defne	23,51±3,69	16,58±0,20	<8	17,23±1,42	<8	<8
Hardal	12,89±0,75	11,74±1,27	12,72±2,52	<8	<8	<8
Isırgan tohumu	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Kabak çekirdeği	<8	13,41±0,33	<8	<8	<8	<8
Kavun	<8	15,32±0,07	<8	<8	<8	<8
Kimyon	23,38±1,07	25,29±1,75	24,90±2,30	21,39±1,12	14,63±1,55	<8
Lavanta	19,46± 0,06	32,40±0,37	17,37±0,01	18,64±1,04	29,06±1,00	16,63±0,30
limon	<8	<8	<8	<8	28,11±0,07	21,77±1,27
Maydanoz	<8	<8	13,31±0,09	<8	<8	<8
Mersin	<8	14,47±0,48	<8	13,14±0,64	<8	<8
Nane	17,36±2,29	16,22±0,15	22,95±1,02	12,61±1,48	<8	<8
Propolis	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Sarımsak	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Sedir	13,27±0,47	12,54±1,66	<8	11,74±0,29	<8	<8
Tarçın	34,65±0,48	38,83±2,08	32,63±0,03	31,36±0,40	26,65±0,93	19,66±1,29
Yasemin	21,72±0,86	26,14±2,97	18,11±0,56	18,36±0,79	15,86±0,83	13,88±0,52
Ylang ylang	15,14±0,68	15,11±1,03	14,23±0,71	<8	14,81±0,55	<8
Yosun	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Zencefil	15,01±0,06	22,66±1,66	15,24±0,49	16,68±1,51	<8	<8
DMSO (NK)	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Vankomycin (PK)	25,03±0,26	24,46±0,38	23,51±0,31	15,67±0,51	18,21±0,22	18,03±0,73

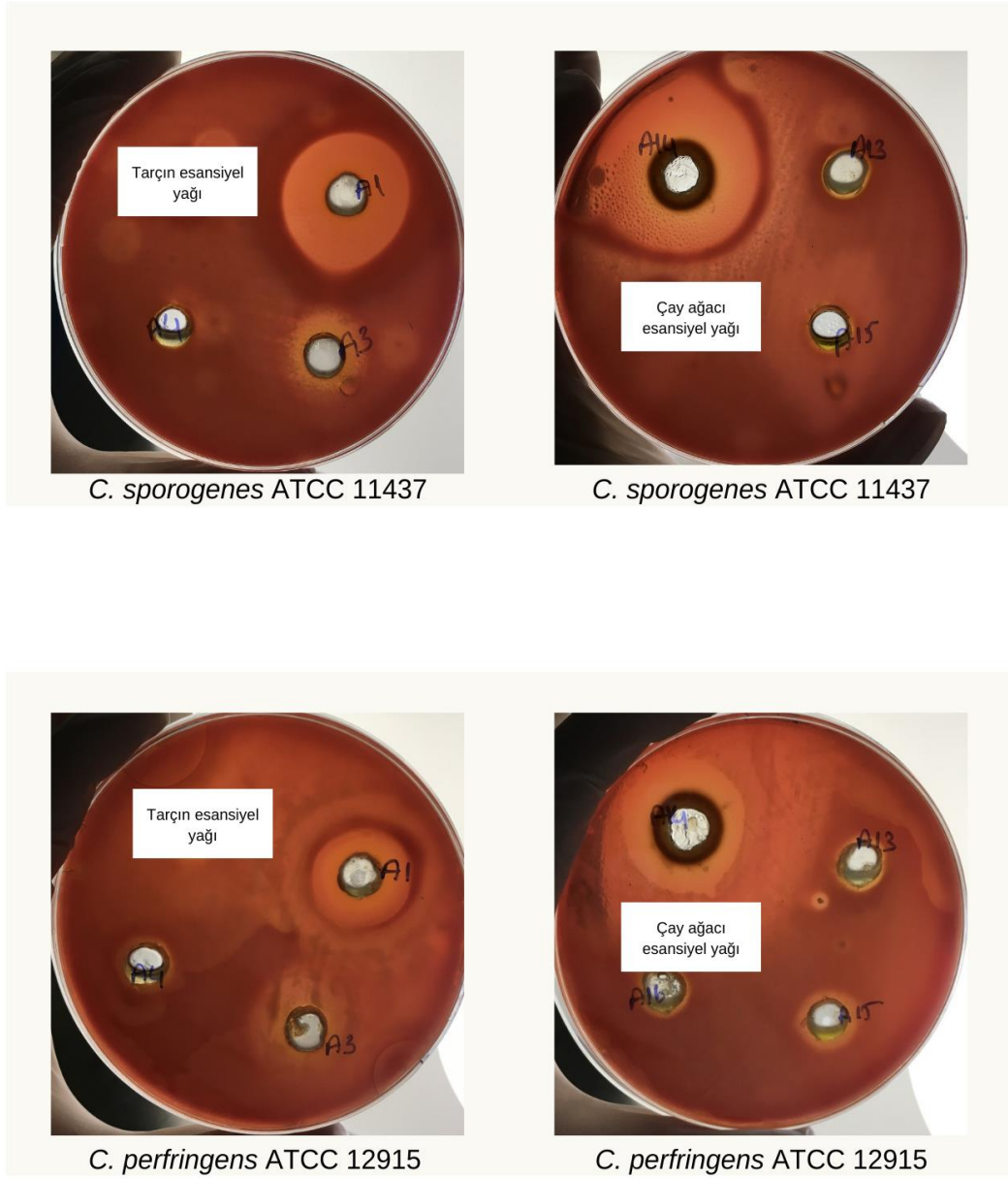
*Kuyucuklar 8 mm çapındadır. İnhibisyon zonları ortalama ±standart hata olarak verilmiştir. Pozitif kontrol olarak Vankomisin (30µg), negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır.



Şekil 25. Toksik olmayan *C. difficile* suşlarına karşı gözlenen agar kuyucuk inhibisyon zonları



Şekil 26. Toksinojenik *C. difficile* suşlarına karşı gözlenen agar kuyucuk zonları



Şekil 27. *C. sporogenes* ve *C. perfringens*'e karşı gözlenen agar kuyucuk inhibisyon zonları

Anaerob mikroorganizmalar için gözlemlenen inhibisyon sonları ile MİK değerleri arasında korelasyon sağlanamadığından disk difüzyon testi (Kirby-Bauer) testi standart yöntemlerde önerilmemektedir (Schuetz, 2014). Diğer taraftan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında disk difüzyon yöntemini kullanan araştırmalar (Holt vd., 2015) ve yöntemin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar mevcuttur (Dubreuil vd., 2020).

Disk difüzyon yönteminde ise 23 doğal maddenin 11'inde inhibisyon zonu gözlenmiştir (Tablo 9). Tespit edilen inhibisyon zonları 8,32–44,18 mm arasında değişmiş,

tarçın ve çay ağacı esansiyel yağları, tüm suşlara karşı agar kuyucuk yönteminde olduğu gibi en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip yağlar olmuştur (Şekil 28). Tarçın ve çay ağacı esansiyel yağlarında en yüksek antibakteriyel aktivite sırasıyla $44,18 \pm 0,53$ ve $26,42 \pm 0,34$ mm zon ile *C. difficile* ATCC 700057'ye karşı belirlenmiştir.

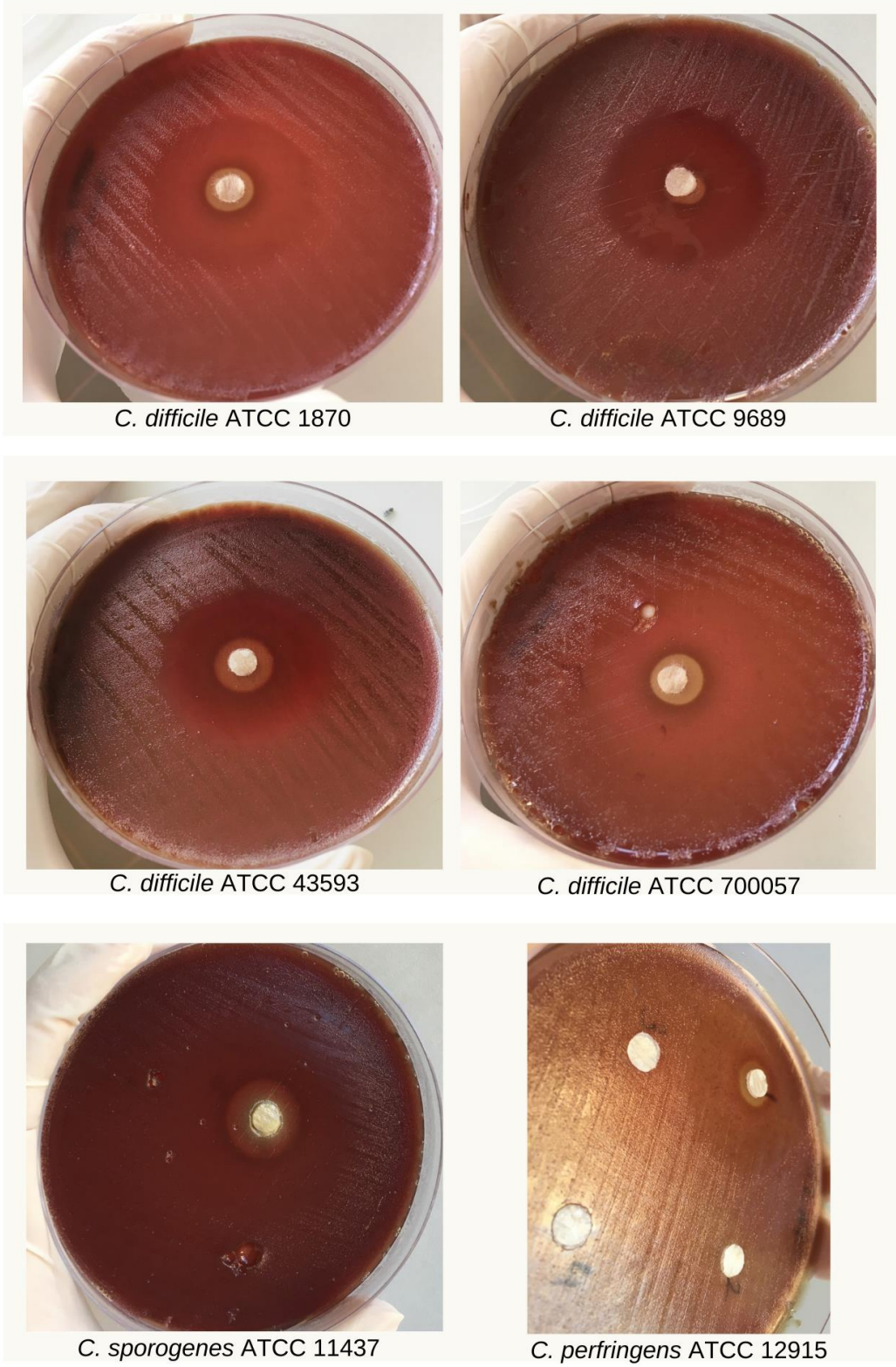
Tablo 9

Doğal maddelerin disk difüzyon inhibisyon zonları (mm)

	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
Acıbadem	<6*	<6	<6	<6	<6	<6
Ardıç	11,16±0,93	12,33±0,56	9,35±0,12	15,74±0,18	<6	<6
Çam- terebentin	11,89±0,79	12,30±0,58	21,85±0,17	10,40±1,20	10,70±0,33	20,22±1,90
Çay ağacı	16,98±0,96	18,54±0,56	26,42±0,34	20,02±2,84	20,41±0,63	23,59±0,02
Defne	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Hardal	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Isırgan otu	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Kabak çekirdeği	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Kavun	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Kimyon	11,77±0,56	13,86±0,06	13,23±0,77	11,76±0,78	9,84±0,06	10,86±0,38
Lavanta	13,12±0,38	14,91±0,65	11,98±0,13	9,10±0,54	9,57±0,31	11,29±0,10
Limon	10,52±0,50	14,24±0,74	13,00±0,14	11,05±0,15	11,12±0,38	13,59±0,02
Maydanoz	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Mersin	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Nane	<6	<6	<6	<6	10,87±0,11	9,65±1,33
Propolis	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Sarımsak	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Sedir	9,65±0,32	10,51±0,72	9,05±0,44	<6	<6	8,87±0,52
Tarçın	36,37±0,39	36,96±0,82	44,18±0,53	36,62±0,88	35,28±0,86	35,59±0,51
Yasemin	11,51±0,07	10,70±0,11	10,45±0,05	<6	<6	<6
Ylang ylang	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Yosun	<6	<6	<6	<6	<6	<6
Zencefil	<6	<6	<6	<6	<6	<6
DMSO (NK)	<6	<6	<6	<6	<6	<6
VAN (PK)	22,77±0,59	22,71±0,30	23,00±0,10	21,12±0,20	20,32±0,16	20,80±0,75

*Diskler 6 mm çapındadır. İnhibisyon zonları ortalama ±standart hata olarak verilmiştir.

Pozitif kontrol olarak Vankomisin (30µg), negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır.



Şekil 28. Tarçın esansiyel yağının disk difüzyon ile oluşturduğu zonlar

Çay ağacı yağının antimikrobiyal etki mekanizmasının, hücre içi materyal kaybı, homeostazi koruyamama ve solunum inhibisyonu, membran bütünlüğü ve fonksiyonunun kaybı ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Carson vd., 2006).

Kimyonun *C. difficile* inhibisyonundaki etkisinin araştırıldığı çalışmalara literatürde rastlanılmamıştır. Ancak yapılan çalışmalar (Gajewska vd., 2019) kimyonun alternatif bir aspirin kaynağı olduğunu, salisilik asit içeriğinin yüksek olduğunu belirtmektedir. Flock (2017), aspirinin %0,05 (2,7 mM) ve %0,1 (5,5 mM) konsantrasyonlarının *C. difficile* ATCC 1805 ve *C. difficile* ATCC 1870 suşlarında sporlanmayı ve spor üretiminde rol oynayan genleri önemli ölçüde baskıladığını, MİK değeri olan %0,15 (w/v) konsantrasyonun ise tamamen inhibe ettiğini belirtmiştir. Aspirinin spor üretimini ve spor büyümesini azaltarak *C. difficile*'nin bulaşmasını ve nüksetmesini kontrol etmek için potansiyel olarak kullanılabileceğini ifade etmiştir. Bu çalışmada kimyon yağında agar kuyucuk yöntemi ile 14,63-25,29 mm arasında değişen inhibisyon zonları gözlenmiştir. Disk difüzyon yönteminde ise inhibisyon zonları 9,84-13,86 mm arasında tespit edilmiştir.

Çalışmamızda zencefil yağı agar kuyucuk yöntemiyle 15,01-22,66 mm arasında inhibisyon zonu meydana getirirken en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *C. difficile* ATCC 9689'a karşı göstermiştir. Disk difüzyon yönteminde ise zencefil yağında test edilen hiçbir bakteriye karşı zon görülmemiştir. Mirtaghi vd., (2014) bu farklılığın agar kuyucuk difüzyon yönteminde antimikrobiyal maddenin doğrudan kuyuya eklenmesi, disk difüzyon yönteminde ise antimikrobiyal maddelerin önce kağıt disklere emdirilmesi ve daha sonra agar yüzeyine yerleştirilmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Roshan vd., (2017) agar kuyucuk yöntemi ile zencefil suyunda (%100, v/v) herhangi bir etki tespit etmezken, zencefilin ana bileşeni olan zingerzone'un orta derecede etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu farklılığın yağlar ve meyve sularındaki aktif bileşiklerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan Justin ve Antony, (2016) toksijenik izolatların %85'inin ve toksik olmayan *C. difficile* izolatlarının %80'inin disk difüzyon yoluyla zencefil yağına duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Sarımsak yağında her iki yöntemde de inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Ancak Roshan vd., (2017) sarımsak suyunda (%100, v/v) *C. difficile* suşlarına karşı 26,1-27,7 mm arasında değişen inhibisyon zonu gözlemlemişlerdir.

Ardıç yağının *C. difficile* üzerinde denendiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Ünlü vd., (2008) *J. excelsa*'nın *C. perfringens*'e karşı disk difüzyon yöntemi ile 30 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ardıç yağı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *C. difficile* ATCC 700057'ye karşı $28,28 \pm 0,09$ mm zon ile göstermiştir.

4.2.2. Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK ve MBK Değerleri

Antimikrobiyal maddelerin etkili olabilmesi için uygun konsantrasyonlarda kullanılması gerekmektedir. Düşük konsantrasyonlarda kullanım sadece etkisiz olmakla kalmadığı gibi, mikroorganizmaların bu maddelere karşı duyarlılıklarının azalmasına sebep olabilir (Rodríguez-Melcón vd., 2022).

Antimikrobiyal maddelerin inhibisyon zonları pozitif kontrol olan vankomisin ile karşılaştırılmış ve en etkili bulunan maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) belirlenmiştir. Çalışmamızda test edilen 23 antimikrobiyal maddeden en etkili 9 tanesinin MİK değerleri belirlenmiş olup, değerler sırasıyla 0,39-12,5 (% , v/v) ve arasında değişmektedir (Tablo 10). Tüm suşlara karşı en küçük MİK değerleri tarçın yağında belirlenmiş ve 0,39-1,56 (% , v/v) arasında saptanmıştır. Çay ağacı yağının MİK değerleri 0,39-3,12 (% , v/v) arasında olup tarçın yağından sonra en düşük MİK değerlerine sahip ikinci yağ olmuştur.

MİK değeri bakterilerin gelişmesini engelleyen konsantrasyonu ifade ederken MBK değeri bakterileri inhibe edecek bakterisidal aktiviteyi tanımlamaktadır. Bu sebeple MBK değerlerinin MİK değerlerinden daha yüksek olması beklenmektedir (Sukmark vd., 2011). Yağların MBK değerleri MİK değerlerinden yüksek olup 1,56->25 (% , v/v) arasında belirlenmiştir. Benzer şekilde Roshan vd., (2017) doğal antimikrobiyal maddelerin *C. difficile*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırdığı çalışmada MBK değerlerini MİK değerlerinden yüksek bulmuştur.

Çalışmamızda nane yağının MİK değeri %25 olarak belirlenirken Roshan vd., (2017) %8 konsantrasyonda *C. difficile* suşlarına karşı hem inhibitör hem de bakterisidal etki gözlemlediklerini belirtmişlerdir.

Tablo 10

Yağların MİK ve MBK değerleri (% , v/v)

		<i>C.difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
Ardıç	MİK	3,12	3,12	6,24	3,12	-	-
	MBK	12,5	3,12	12,5	12,5	-	-
Çam- terebentin	MİK	6,24	0,78	0,78	3,12	1,56	0,78
	MBK	12,5	6,24	6,24	>25	>25	25
Çay ağacı	MİK	1,56	0,78	0,39	1,56	3,12	3,12
	MBK	3,12	3,12	1,56	3,12	6,24	6,24
Kimyon	MİK	6,25	12,5	3,12	3,12	-	-
	MBK	12,5	>25	>25	25	>25	>25
Lavanta	MİK	1,56	1,56	3,12	3,12	3,12	3,12
	MBK	6,24	25	25	>25	>25	>25
Limon	MİK	6,24	6,24	6,24	6,24	6,24	3,12
	MBK	12,5	12,5	12,5	12,5	25	12,5
Nane	MİK	-	-	-	-	25	25
	MBK	-	-	-	-	>25	>25
Tarçın	MİK	0,39	0,39	0,39	1,56	0,78	0,78
	MBK	6,24	12,5	6,24	6,24	6,24	3,12
Yasemin	MİK	12,5	12,5	12,5	-	-	-
	MBK	25	25	6,24	-	-	-

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon

Bu çalışmada hem agar kuyucuk hem de disk difüzyon yöntemleri çalışılmış ve MİK değerleri arasındaki korelasyon belirlenmiştir. Agar kuyucuk zonları ile MİK değerleri arasında zayıf korelasyon saptanmıştır ($r: 0,435, P: 0,006$). Disk difüzyon zonları ile MİK değerleri arasında ise yüksek bir korelasyon bulunmuştur ($r_{spearman}: 0,751, P < 0,0001$).

4.2.3. Yağların Uçucu Yağ Profilleri

Disk difüzyon ve agar kuyucuk yöntemleri ile en yüksek antibakteriyel etki belirlenen ve en düşük MİK ve MBK değerine sahip yağlar tarçın, çay ağacı ve ardıç olmuştur. Bu yağların uçucu bileşenleri GC-FID-MS ile belirlenmiştir (Tablo 11). En yüksek oranda bulunan aktif bileşen tarçın esansiyel yağında sinnamaldehit (%85,64) iken, çay ağacı esansiyel yağında 4-terpineol (%83,60) olarak belirlenmiştir. Ardıç yağında ise en yüksek oranda bulunan uçucu bileşen 2,4-decadienal (%26,60) olarak belirlenmiştir.

Tablo 11

Etkin bulunan yağların uçucu yağ profilleri

	<i>Melaleuca alternifolia</i>			<i>Cinnamomum zeylanicum</i>			<i>Juniperus communis</i>		
	RT (min)	LRI	Area (%)	RT (min)	LRI	Area (%)	RT (min)	LRI	Area (%)
D-Limonene	17,09	1185	0,4	17,06	1185	0,01	17,09	1185	0,42
Eucalyptol	17,54	1199	0,2	17,53	1199	0,01	-	-	-
γ -Terpinene	19,23	1230	1,2	-	-	-	-	-	-
o-Cymene	20,23	1268	1,8	-	-	-	20,20	1268	1,21
p-Cymene	-	-	-	20,21	1261	0,05	-	-	-
Terpinolene	20,92	1288	0,4	-	-	-	-	-	-
α -Cubebene	-	-	-	-	-	-	28,25	1455	1,66
α -Copaene	-	-	-	-	-	-	29,50	1488	1,27
Benzaldehyde	-	-	-	29,79	1528	0,03	-	-	-
Linalool	30,89	1552	0,2	30,89	1552	1,71	30,89	1552	0,82
p-Menth-3-en-1-ol	31,97	1587	0,1	-	-	-	-	-	-
Isobornyl acetate	-	-	-	-	-	-	32,21	1554	1,36
β -Elemene, (-)-	-	-	-	-	-	-	32,77	1576	1,64
4-terpineol	33,00	1594	83,6*	32,97	1594	0,01	32,97	1594	6,31
β -Caryophyllene	-	-	-	33,18	1597	2,71	33,20	1597	5,86
Humulene	-	-	-	-	-	-	36,12	1662	4,36
α -Terpineol	36,65	1675	2,8	36,84	1675	0,63	36,84	1665	4,03
Terpinyl acetate	-	-	-	36,97	1689	0,08	-	-	-
γ -Elemene	36,98	1696	0,6	-	-	-	-	-	-
γ -Murolene	-	-	-	-	-	-	38,18	1671	2,85
2,4-Nonadienal, (E,E)-	-	-	-	-	-	-	39,16	1681	15,03
δ -Cadinene	-	-	-	-	-	-	39,29	1742	11,97
2,4-Decadienal, (E,E)-	40,62	1797	1,7	40,62	1797	0,01	40,62	1797	26,60
Anethole	41,03	1837	0,2	-	-	-	41,03	1837	2,65
trans-Calamenene	-	-	-	-	-	-	41,51	1844	2,14
p-Cymen-8-ol	-	-	-	-	-	-	41,65	1848	0,69
(Z)-Cinnamaldehyde	-	-	-	42,85	2018	0,56	-	-	-
Hydrocinnamyl isobutyrate	-	-	-	44,22	2024	0,02	-	-	-
Caryophyllene oxide	-	-	-	45,36	2028	0,02	45,54	2028	1,96
Cinnamyl formate	-	-	-	46,06	2030	0,03	-	-	-
Cinnamaldehyde	46,43	2032	1,2	46,59	2032	85,64	46,43	2047	3,74
(E)-Cinnamaldehyde	-	-	-	46,82	2047	0,17	-	-	-
Humulene-1,2-epoxide	-	-	-	-	-	-	46,87	2128	1,87
Aromadendrene oxide-(2)	-	-	-	-	-	-	47,95	2299	1,02
Isopropyl myristate	46,87	2041	0,9	48,94	2167	5,87	-	-	-
Spathulenol	-	-	-	-	-	-	48,58	2305	0,55
Eugenol	-	-	-	49,19	2172	1,43	-	-	-
Thymol	-	-	-	49,51	2180	0,08	-	-	-
Cinnamyl alcohol	-	-	-	51,46	2274	0,90	-	-	-
Auraptanol	54,68	2298	4,7	-	-	-	-	-	-

*Kalın yazı tipi ile belirtilen değerler en yüksek oranda saptanan maddelerdir. RT: Alınma zamanı LRI: linear retention index

Tarçının ana bileşeni olan sinamaldehyt aromatik bir aldehittir (Wang vd., 2021). Mooyottu vd., (2014) karvakrol ve trans-sinamaldehytin *Vero* hücrelerinde *C. difficile* toksin üretimini ve sitotoksitesiyi azalttığı ifade edilmiştir. Ayrıca sinamaldehyt ve öjenolün bağırsağı, enfeksiyon ve oksidatif stres koşullarından kaynaklanan yaralanmalardan koruduğu belirtilmiştir (Błaszczuk vd., 2021). Bu nedenle tarçının bağırsak sağlığını iyileştirerek *C. difficile* enfeksiyonlarına karşı koruyucu veya tedavi edici bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Roshan vd., (2018) trans-sinamaldehytin mikrodilüsyon ile

belirledikleri MİK değerini test ettikleri tüm *C. difficile* suşları için %0,02 (v/v) olarak tespit etmişlerdir.

Çay ağacında Terpinen-4-ol antimikrobiyal madde özelliğinden sorumlu biyoaktif madde olarak sayılmaktadır (Southwell vd., 1993). Bu çalışmada da 4-terpineol çay ağacında en yüksek miktarda bulunan aktif bileşen olmuştur. Johansen vd., (2020), çay ağacı esansiyel yağının *C. difficile* ve *C. sporogenes*'e karşı MİK değerini bizim çalışmamızdan daha düşük tespit etmişlerdir. 4-terpineol yüzdesi bizim çalışmamızda daha yüksek olmasına rağmen aradaki bu farklılığın test edilen suşlardaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ardıç yağında en yüksek oranda bulunan aktif madde 2,4-decadienal olmuştur. Trombetta vd., (2002) 2,4-decadienal'ın antimikrobiyal aktivitesinin plazmatik membranın yağ tabakasında bozulmaya neden olarak bakteri hücresi içine nüfuz edebildiğini belirtmişlerdir.

4.2.4. Dama Tahtası Sinerji Testi

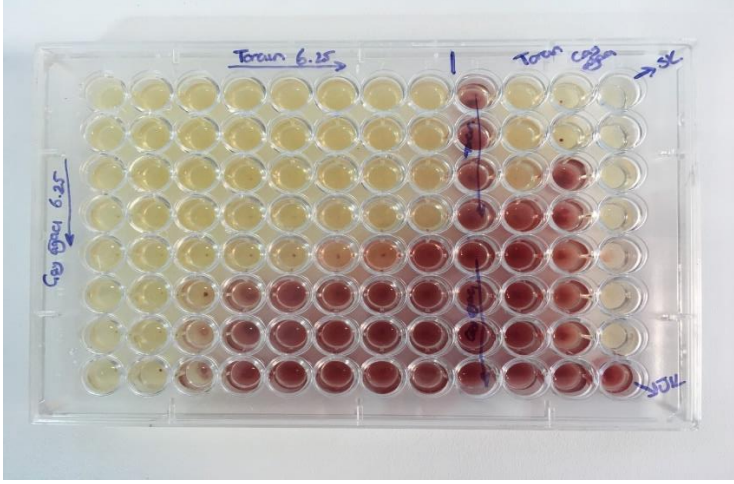
Antibiyotiklere karşı oluşan çoklu ilaç direnci, bakteriyel patojenlerin neden olduğu hastalıkların şiddetinin artmasına neden olmuştur (Swamy vd., 2016). Metronidazol, vankomisin ve fidomiksin *C. difficile* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önerilmektedir (Sholeh vd., 2020). Bununla birlikte *C. difficile*'nin bu antibiyotiklere karşı giderek direnç kazandığı da sürekli rapor edilmektedir (Harnvoravongchai et al., 2017). Vankomisin bakteri hücre duvarı sentezini beta laktam antibiyotiklerden daha önceki bir aşamada inhibe eden glikopeptid yapıda bir antibiyotiktir (Scholar, 2007). *C. difficile*'deki vankomisin direnç mekanizmasının halen belirsiz olduğu ifade edilmiştir (Banawas, 2018).

Kronik hastalıkların tedavisindeki sınırlı etkinlik, tedaviye direnç ve sentetik mono ilaçların yan etkilerinin gözlenmesi, mono ilaç tedavileri yerine çoklu aktif bileşenlerin kullanıldığı kombinasyon tedavilerinin benimsenmesine yol açmıştır (Zhou vd., 2016). Dama tahtası sinerji testi, ikili antimikrobiyal madde kombinasyonlarında sinerji ve antagonizmin belirlenmesi için kullanılabilen bir yöntem olarak belirlenmiştir (Berenbaum, 1978). Ancak aynı özelliklere sahip mikroorganizmalar ile aynı antimikrobiyal madde kombinasyonlarının dama tahtası yöntemi ile denendiği farklı çalışmalarda farklı FİK

değerlerinin saptandığı da görülmektedir. Bu durumun çalışmalarındaki sinerji oranlarının farklı yorumlanmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Özseven vd., 2012). Isenberg (1992) tarafında ortaya koyulan en düşük FİK değerini kabul etme yöntemi yorum farklılıklarının araştırıldığı bir çalışmada (Özseven vd., 2012) sinerjiyi en yüksek oranda tespit eden yöntem olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda en küçük FİK değerini kabul etme yöntemine göre (Isenberg, 1992) değerlendirme yapılmıştır.

Bitkisel materyaller kombinasyon halinde kullanıldığında aralarındaki ilişki karmaşık olabileceği gibi, beklenen etkileşim ilave terapötik fayda ile sonuçlanabilmektedir (Che vd., 2013). Bitkisel maddelerin sinerjistik terapötik etkilerinin altında yatan mekanizmalar şunlardır: (i) farklı maddeler çeşitli iz yolları ile aynı veya farklı hedefi düzenleyebilir. Agonistik veya sinerjistik bir şekilde işbirliği yapabilir (ii) oral ilaç biyoyararlanımını iyileştirmek için hepatik ve bağırsak metabolizmasında yer alan enzimleri ve taşıyıcıları düzenleyebilir (iii) mikroorganizmaların direnç mekanizmalarını kontrol altında tutabilir veya (iv) etkileşim yoluyla ajanların yan etkilerini azaltarak ve farmakolojik yararı artırarak etki gösterebilir (Yang vd., 2014).

Tüm suşlara karşı en yüksek antimikrobiyal etkiye ve düşük MİK değerlerine sahip olan tarçın ve çay ağacı yağları arasındaki sinerji ile tarçın yağı ve *C. difficile* ile ilişkili hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan vankomisin arasındaki sinerji dama tahtası testi ile belirlenmiştir (Şekil 29). Vankomisin ve tarçın esansiyel yağının kombinasyonundaki etki aditif (FİK: 0,519) olarak değerlendirilmiştir. 0,015 µg/mL olarak belirlenen vankomisin MİK değerinin %0,19 tarçın varlığında 0,00048 µg/mL'ye düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca tarçın esansiyel yağının 0,39 (% v/v) olan MİK değeri vankomisin varlığında iki kat azalmıştır. Tarçın ve çay ağacı esansiyel yağlarının kombinasyondaki ilişkisi de aditif etki olarak değerlendirilmiştir. (FİK: 0,517). Tarçın esansiyel yağının tek başına MİK değeri (%0,39), çay ağacı esansiyel yağı varlığında 2 kat (%0,19) azalma göstermiştir. Diğer taraftan, çay ağacı esansiyel yağının MİK değeri (%1,56), tarçın esansiyel yağı varlığında 33 kat (%0,047) azalma göstermiştir (Tablo 12).



Şekil 29: Dama tahtası sinerji testi

Yapılan bir çalışmada 20 µg/mL trans-sinamaldehit varlığının klindamisin dirençli *C. difficile* için MİK değerini 4,0'dan 0,25 µg/mL'ye 16 kat düşürdüğünü ve trans-sinamaldehitin düşük konsantrasyonlarının, klindamisin antimikrobiyal etkisini artırdığını ve doğal ürünlerin *C.difficile*'ye karşı kombinasyon tedavisi için kullanılmasının klinik fayda sağladığını ifade etmişlerdir (Shahverdi vd., 2007).

Tablo 12

Uçucu yağlar ve vankomisin arasındaki sinerjistik aktivite

Mikroorganizma	Çay ağacı yağı (%)			Vankomisin (µg/mL)		
	Çay ağacı	Tarçın	FİK	VAN	Tarçın	FİK
<i>C.difficile</i>	-	0,39	-	-	0,39	-
ATCC 1870	1,56	-	-	0,015	-	-
	0,047	0,19	0,517	0,00048	0,19	0,519

VAN: Vankomisin FİK: Fransiyonel inhibisyon konsantrasyonu

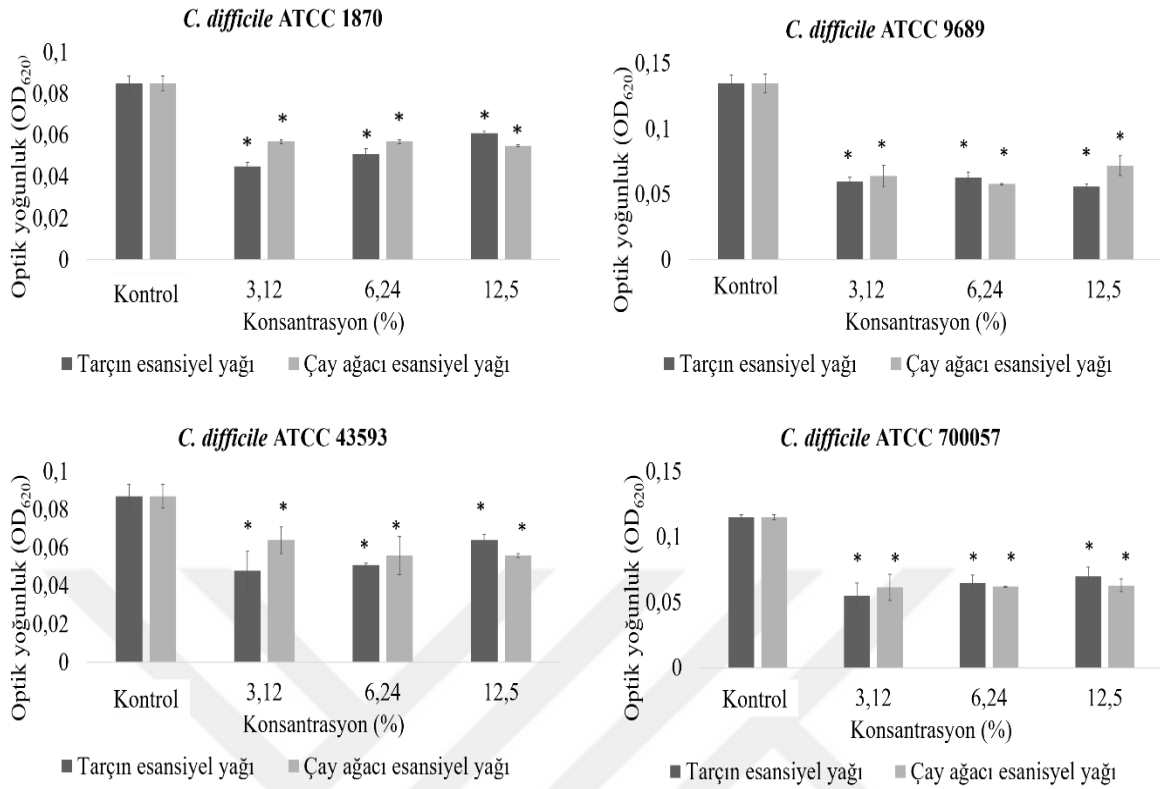
4.2.5. Yağların Antibiyofilm Yetenekleri

C. difficile'deki biyofilm mekanizması ve enfeksiyonun tekrarlamasındaki rolü hala açık değildir. Ancak, hücrelerin motilitesi, yapışması ve hidrofobikliği dahil olmak üzere *C. difficile*'nin biyofilm oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmuştur (Taggart vd., 2021). Đapa vd., (2013), virülans ile ilişkili proteinler, Cwp84, flagella ve varsayılan çekirdek algılama düzenleyicisi LuxS'nin tamamının *C. difficile* tarafından maksimum biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Doğal ürünlerin antibiyofilm etkileri polimer matriks oluşumunun engellenmesi, hücre tutunmasının ve bağlanmasının baskılması, ekstraselüler matriks oluşumunun engellenmesi ve virülans faktörlerinin üretiminin azalması, böylece QS ağı ve biyofilm gelişiminin engellenmesi esaslarına dayanmaktadır (Lu vd., 2019). Đapa vd., (2013) klostridiyal biyofilmlerdeki bakterilerin, *C. difficile* ile ilişkili hastalıklar tedavisinde sıklıkla kullanılan vankomisine karşı daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada (Vuotto vd., 2016), alt inhibitör konsantrasyondaki (MİK değerinin altı) metronidazolün, *C. difficile* suşları tarafından biyofilm üretiminin arttırılmasında önemli rol oynadığı ifade edilmektedir.

Hem tarçın hem çay ağacı esansiyel yağlarında test edilen tüm konsantrasyonlarda, test edilen tüm *C. difficile* suşlarına karşı antibiyofilm aktivite gözlenmiştir (Şekil 30). Her iki yağın antibiyofilm aktiviteleri arasında istatistiki anlamda bir fark saptanmamıştır ($P>0,05$). Bununla birlikte, her iki uçucu yağda da %12,5'in üzerindeki konsantrasyonlarda plakalar üzerinde aşındırıcı bir etki tespit edilmiştir. Bu zarar verici etki, çay ağacı esansiyel yağında daha çarpıcı bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca çay ağacı esansiyel yağı konsantrasyonu arttıkça antibiyofilm aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ancak ilginç bir şekilde tarçın esansiyel yağında bunun tam tersi bir etki gözlemlenmiştir. Bu durum konsantrasyon arttıkça korozif etkinin artması veya yıkama sonrası plak üzerinde kalan yağ kalıntısı ile açıklanabilir.

C. difficile biyofilminin inhibisyonu üzerine doğal maddelerin araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Manuka balının antibiyofilm aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada (Hammond ve Donkor, 2013), *C. difficile* suşlarının 24 ve 48 saat içinde oluşturdukları biyofilm miktarları arasında bir fark olmadığı ve manuka balının optimum antibiyofilm aktivitesinin %40-50 (v,v) konsantrasyonda gözlendiğini belirtmişlerdir. Costa vd., (2021) kırmızı propolisin *C. difficile* biyofilm büyümesini azalttığını ve *C. difficile*'nin olgun biyofilmlerine zarar verdiğini belirtmişlerdir. Harnvoravongchai vd., (2018) asiatic asitin *C. difficile* vejetatif hücrelerine karşı antibakteriyel etki gösterdiğini ancak biyofilm oluşumu üzerine bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Literatürde çay ağacı ve tarçın yağlarının *C. difficile* biyofilmleri üstündeki inhibisyon etkisinin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır.



Şekil 30. Tarçın ve çay ağacı yağlarının *C. difficile* suşları üzerindeki antibiyofilm aktiviteleri. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalama \pm standart hatası olarak sunulmuştur. * Kontrol değerlerine karşı $P < 0,05$

4.3. Araştırma 3. Doğal Antimikrobiyal maddelerin *C. difficile* Sporları Üzerindeki Etkisi

C. difficile'nin vejetatif formu üzerinde etkili olan ve düşük MİK değerlerine sahip olan yağlar spor formu üzerinde de çalışılmıştır.

4.3.1. Doğal Antimikrobiyal Maddelerin MİK Değerleri

C. difficile'nin vejetatif formu üzerinde etkili olan ve düşük MİK değerlerine sahip olan yağlar spor formu üzerinde çalışılmıştır (Şekil 31). Sporlara karşı belirlenen MİK değerleri 0,78-25 (% v/v) arasında değişmektedir (Tablo 13). En düşük MİK değeri tarçın yağında (%0,78) *C. sporogenes* ve *C. perfringens*'e karşı belirlenmiştir. *C. difficile* suşlarına karşı en düşük MİK değerine sahip yağ ise yine tarçın olmuştur. Toksinogenik suşlar olan *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. difficile* ATCC 1870 için MİK değeri %3,12 belirlenirken, toksinogenik olmayan *C. difficile* ATCC 700057 ve *C. difficile* ATCC 43593 için MİK değeri

%6,24 belirlenmiştir. Sporlara karşı en yüksek MİK değeri ise ardıç yağında *C. difficile* ATCC 1870 için %25 olarak saptanmıştır.

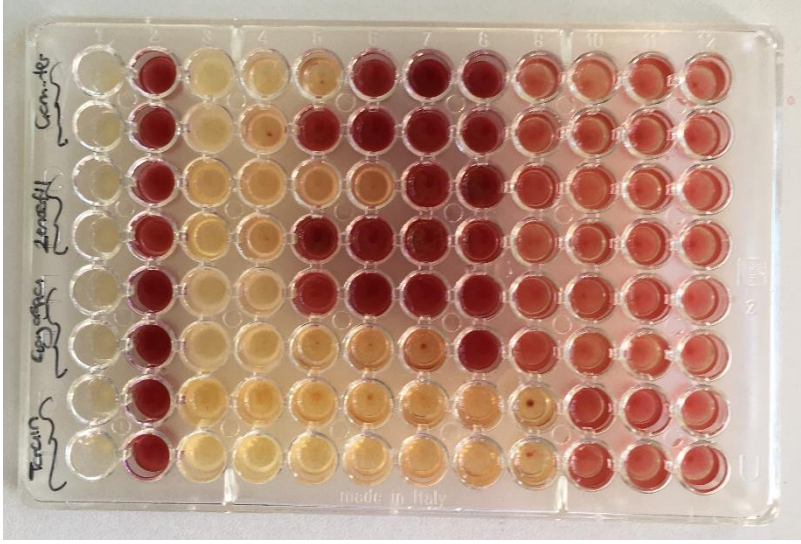
C. difficile, çoğu dezenfektan ve antibiyotiğe dirençli olan ve çevrede ve bağırsak kolonunda uzun süre kalabilen endosporlar oluşturmaktadır. *C. difficile* ile ilişkili hastalıklar ağızdan alınan sporlar ince bağırsakta çimlendiğinde ve ortaya çıkan vejetatif hücreler çoğaldığında, kolonda güçlü eksotoksinler salgıladığında ortaya çıkmaktadır (Srisuwan vd., 2018).

Tablo 13

Doğal antimikrobiyal maddelerin sporlara karşı MİK değerleri (% , v/v)

Esansiyel yağ	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
Ardıç	25	-	-	-	-	-
Çam-terebentin	-*	-	-	6,24	-	-
Çay ağacı	6,24	6,24	12,5	12,5	1,56	3,12
Defne	-	-	-	-	-	-
Kimyon	12,5	-	12,5	-	-	-
Lavanta	-	25	-	-	12,5	12,5
Limon	-	-	-	-	1,56	1,56
Nane	-	-	25	-	-	-
Tarçın	3,12	3,12	6,24	6,24	0,78	0,78
Zencefil	-	12,5	-	-	-	-

*Vejetatif forma karşı belirlenen MİK değerleri yüksek olduğu için spor formunda çalışılmamıştır.



Şekil 31: Mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlenmesi

C. difficile ile ilişkili hastalıklar (CDE) için yeni tedaviler arasında spor çimlenmesinin inhibisyonu ve fekal mikrobiyota transplantasyonu yer almaktadır. Doğrudan *C. difficile* suşlarının kontrolü için etkili antimikrobiyallerin kısıtlı olduğu ifade edilmektedir (Srisuwan vd., 2018).

Rhodomyrtus tomentosa bitkisinden elde edilen rhodomyrtone maddesinin 0,625 mg/L konsantrasyonda *C. difficile* spor gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Srisuwan vd., 2018). Başka bir çalışmada, 5,6 µg/mL nisin A varlığında *C. difficile* spor canlılığında %40-50 azalma olduğu tespit edilmiştir (Le Lay vd., 2016).

Roshan vd., (2018), enginar ekstraktının (18,8 mg/mL), taze soğan ekstraktının (%25, v/v), Manuka balının (%8, w/v) ve allisinin (75mg/mL) *C. difficile* germinasyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

4.3.2. Sporisidal Aktivitenin Matematiksel Modellemesi

C. difficile sporlarının enfeksiyonun taşınmasında ve kalıcılığında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Barra-Carrasco ve Paredes-Sabja, 2014). Vakaların yaklaşık %10-35'inde, CDE semptomları ortadan kalktıktan ve tedavi tamamlandıktan sonra enfeksiyonun tekrarlayabildiği belirlenmiştir. Tekrarlayan CDE vakalarının yaklaşık yarısının, mevcut suş ile nüksetmesinden ziyade yeniden enfeksiyona bağlı olduğu

düşünülmektedir (Moore vd., 2013). CDE insidansı, *C. difficile*'nin organik ve inorganik yüzeylerde aylarca hayatta kalabilen (Dyer vd., 2019) ve ısı, oksijen ve dezenfektanlar gibi stres faktörlerine dirençli olan sporlar ile doğrudan ilişkilidir (Brown vd., 2018). Sağlık hizmeti ortamında CDE'nin ve bulaşmanın temel kaynağı, genellikle yüzeylerin kontaminasyonu yoluyla fekal-oral yollardır (Dyer vd., 2019). Bulaşma döngüsünün CDE'li hastaların dışkı yoluyla derilerini, giysilerini ve yatak yüzeylerinin spor ile kontaminasyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır (Barra-Carrasco ve Paredes-Sabja, 2014). Hastane koridorlarından, ayakkabılardan (Lim vd., 2020), klozetlerden, çöp kutularından ve tek kullanımlık yatak örtülerinden (Malamou-Ladas vd., 1983) *C. difficile* izole edilmiştir. Aynı zamanda tekrarlayan CDE'ye sahip hastaların evlerinde tuvalet ve banyo lavabolarında da *C. difficile* varlığı saptanmıştır (Shaughnessy vd., 2016)

C. difficile sporlarını yaygın olarak barındıran yüzeyleri (yatak korkulukları, çağrı düğmeleri, telefonlar, zeminler) yeterince dezenfekte etmek önemlidir (Gerding vd., 2008). *C. difficile* sporlarının çevresel kontrolü için sodyum hipoklorit gibi klor bazlı dezenfektanlar önerilmektedir. Ancak hipokloritin uzun süre kullanımı çevreye zarar vermektedir ve etkinliği ve güvenli kullanımı kesin değildir (Uwamahoro vd., 2018). Cansız yüzeylerde korozyona sebep olmasının yanında, temizlik yapan kişilerde solunum rahatsızlıklarını tetikleyebilmektedir (Gerding vd., 2008). *C. difficile*'nin sağlık çalışanlarının ellerinden de izole edildiği (Landelle vd., 2014) düşünüldüğünde klor bazlı ürünlerin yanı sıra alternatif sporisidal dezenfektanlara ihtiyaç bulunmaktadır.

C. difficile sporları, deterjanlarla rutin çevre temizliğine ve alkol bazlı jellere karşı direnç göstermektedir (Gerding vd., 2008). *C. difficile*'nin çevresel kaynaklarının azaltılması, kolonizasyonu ve böylelikle de *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonların azaltılabileceği düşünülmektedir. Çevresel kaynaklardaki spor sayısını azaltmak için Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) klor bazlı dezenfektanları önermektedir. Ancak ortamdaki spor varlığını azaltmak için herhangi bir kimyasal dezenfektanın etkinliğini destekleyen hiçbir kanıt yoktur (MacLeod-Glover ve Sadowski, 2010).

Bu çalışmada tarçın yağının MİK/2, MİK ve 2MİK konsantrasyonlarının toksinojenik *C. difficile* sporları üzerindeki sporisidal aktivitesi zamana karşı incelenmiştir. Tarçın yağı varlığında *C. difficile* spor canlılığı Tablo 14'de gösterilmiştir. %1,56 tarçın yağı

varlığında *C. difficile* ATCC 9689 sporları 168 saat sonunda 1,49 log kob/mL azalmıştır. *C. difficile* ATCC 1870 sporları ise bu süre sonunda 2,96 log kob/mL azalmıştır. MİK değeri olan %3,12 tarçın yağı varlığında ise, her iki spor üzerinde de 24 saat sonunda spor canlılığında belirgin bir azalma olmuş ancak uygulama süresi arttıkça önemli bir değişiklik olmamıştır. %6,24 tarçın yağı varlığında ise *C. difficile* ATCC 9689 sporlarında 24 saat sonunda 4,14 log kob/mL azalma gerçekleşmiş ancak uygulama süresi arttıkça bu sporisidal aktivite korunamamıştır. *C. difficile* ATCC 1870 sporlarında ise 24 saat sonunda 3,59 log kob/mL azalma sağlanmış olup sporların yağ ile temas süresi arttıkça sporisidal aktivitede önemli bir değişiklik olmamıştır. Yapılan bir çalışmada tarçının temel aktif bileşeni olan transsinamaldehitin (%32, v/v) *C. difficile* suşlarına karşı 7 gün sonunda 2 log azalma sağlayarak sporisidal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda 24 ve 48 saatte bir azalma gözlenmezken 7 gün sonunda nane yağında (%32, v/v) *C. difficile* ATCC 700057 sporlarında 2 log azalma gözlemlenmiştir (Roshan vd., 2018).

Tablo 14

Tarçın yağı varlığında *C. difficile* spor canlılığı (log kob/mL)

Konsantrasyon (%, v/v)	Süre (saat)	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. difficile</i> ATCC 1870
1,56	0	8,35±0,01	8,76±0,02
	24	8,14±0,02	5,82±0,13
	48	8,13±0,01	5,72±0,02
	120	7,56±0,25	5,57±0,01
	144	7,11±0,02	5,67±0,04
	168	6,86±0,03	5,8±0,01
3,12	0	8,35±0,01	8,76±0,10
	24	5,42±0,04	5,85±0,01
	48	5,45±0,03	6,61±0,01
	120	5,43±0,01	5,74±0,01
	144	5,56±0,05	5,56±0,05
	168	5,73±0,05	5,89±0,01

Tablo 14'ün devamı

6,24	0	8,35±0,01	8,76±0,02
	24	4,21±0,02	5,17±0,01
	48	5,22±0,01	5,21±0,02
	120	5,38±0,02	5,16±0,01
	144	5,44±0,01	5,23±0,01
	168	5,68±0,01	5,29±0,01

Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir. DMSO negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Zamana karşı inhibisyon eğrisi çalışmaları antibakteriyel aktivitenin dinamik davranışını daha iyi tanımlamaktadır ve daha doğru bir MİK değerinin belirlenmesine olanak sağladığı belirtilmektedir. Bu eğriler, genellikle antibakteriyel aktivite ve antibakteriyel konsantrasyon arasındaki ilişkinin sigmoid bir şekle sahip olduğu varsayımına dayalı olarak çeşitli matematiksel modeller kullanılarak analiz edilmektedir (Jaiswal ve Jaiswal, 2015). Antimikrobiyal maddelerin mikrobiyal inhibisyonunun modellendiği çalışmalar oldukça kısıtlı olmakla birlikte çeşitli mikroorganizmalara karşı özellikle esansiyel yağların antimikrobiyal etkisinin modellendiği çalışmalar bulunmaktadır (Koutsoumanis vd., 1999; Özçakmak ve Gül, 2017; Basak ve Guha, 2017).

Matematiksel bir modelin uyumu, elde edilen tahmini değerlendirmek için genel bir ölçü olan korelasyon katsayısının (R^2) değeri ile ifade edilmektedir. Bu değer ne kadar büyük olursa ($0 < R^2 < 1$) tahminde kullanılan modelin verilere o kadar uygun olduğu ifade edilmektedir (Jaiswal ve Jaiswal, 2015). Ayrıca modeldeki tahmin edilen veriler ile deneysel veriler arasındaki farkı değerlendirmek için istatistiksel bir ölçü olan ortalama karekök hata (RMSE) değeri modelin verilere uygunluğunu ifade eden başka bir değerdir. Düşük RMSE değerine sahip model ($0 < RMSE$) tahminlemede en uygun model anlamına gelmektedir (Jaiswal ve Jaiswal, 2015).

Çalışmamızda daha doğru bir MİK değeri belirlemek adına zamana karşı karşı belirlenen sporisidal aktivite log-lineer, Weibull ve Modifiye Gompertz modelleri ile tanımlanmış ve verileri en doğru tanımlayan model belirlenmiştir.

Tarçın esansiyel yağının sporisidal aktivitesi sporların antimikrobiyal uygulamaya eşit direnç gösterdiği varsayılan log-lineer ile modellendiğinde R² değerleri 0.27 ile 0.96 ve RMSE değerleri 0,13 ile 1,32 arasında değişmiştir (Tablo 15). Her iki parametre de log lineer ile modellemenin uygun olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda konsantrasyon artışına bağlı olarak D değerinde artma ya da azalmadan bahsedilememektedir.

Tablo 15

Sporisidal aktivitenin Log-lineer ile modellenmesi

Mikroorganizma	Konsantrasyon		Parametreler		
	(%, v/v)	k _{max} (h ⁻¹)	D(h)	R ²	RMSE
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	1,56	0,02	114,94	0,96	0,13
	3,12	0,02	112,35	0,27	1,10
	6,24	0,01	163,93	0,09	1,48
<i>C. difficile</i> ATCC 1870	1,56	0,03	90,90	0,37	1,10
	3,12	0,02	94,33	0,34	1,12
	6,24	0,03	82,64	0,33	1,32

kmax: maksimum ölüm hızı D: 1 logaritma birimlik azalma için gereken süre

Weibull modelinde ise R² değerleri 0,46 ile 0,98 arasında değişirken RMSE değerleri 0,09-1,31 arasında değişmektedir (Tablo 16). *C. difficile* ATCC 9689'a uygulanan %1,56 konsantrasyondaki tarçın yağı işleminde β değeri 1'den büyüktür. Diğer konsantrasyonlarda zamanla direnç kazanılırken %1,56 konsantrasyonunda sporlar bu işleme duyarlılık göstermiştir. *C. difficile* ATCC 1870'e uygulanan tüm konsantrasyonlarda hayatta kalma eğrisi iç bükeydir ve zamanla sporlar direnç kazanmıştır. Benzer şekilde *B. coagulans* sporlarına karşı sıcaklık ve kekik esansiyel yağının inaktivasyonunun araştırıldığı bir çalışmada (Haberbeck vd., 2012) 500mg/g kekik yağı uygulamasında daha hızlı spor azalması sağlandığı ancak 400 mg/g konsantrasyonun hem daha düşük organoleptik etkiye sahip olduğu hem de sporların direncinde önemli bir azalmayı sağladığı ve sporları termal işlemlere karşı kekik esansiyel yağının daha duyarlı hale getirebileceği belirtilmiştir. Soetjpto ve Martono, (2017) yaptıkları çalışmada esansiyel yağların konsantrasyonu arttıkça, antimikrobiyal aktivitelerinde azalma tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu durumun konsantrasyon arttıkça emülsiyonun stabilitesinin ve çözünürlüğünün azalması ve/veya yağın bakteri hücrelerine nüfuz etmesinin zorlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer taraftan *C. difficile* ATCC 9689'a uygulanan %1,56'lık konsantrasyona karşı sporlar zamanla direnç kazanmasa da 1 log birimlik azalma için gerekli süre 136.73 saattir. %3,12 konsantrasyon ise 1 log birimlik azalmayı bu suş için 7,8 dakikada sağlamaktadır. %6,24 konsantrasyon varlığında ise bu süre 62,91 saat olarak belirlenmiştir. *C. difficile* ATCC 1870 için ise δ değerleri 1,01 ile 5,40 saat arasında değişmektedir. En kısa sürede (1,01 saat) spor popülasyonunda %90 azalma sağlanan konsantrasyon %3,12 olmuştur.

Tablo 16

Sporisidal aktivitenin Weibull ile modellenmesi

Mikroorganizma	Konsantrasyon (%, v/v)	Parametreler			
		δ	β	R ²	RMSE
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	1,56	136,73	1,77	0,98	0,09
	3,12	0,13	0,12	0,88	0,50
	6,24	62,91	0,00	0,46	1,31
<i>C. difficile</i> ATCC 1870	1,56	5,14	0,17	0,76	0,78
	3,12	1,01	0,15	0,81	0,68
	6,24	5,40	0,22	0,71	0,99

δ : Sporların bir logaritma birimlik azalması için gerekli süre (saat) β : Eğrinin şekli

Gompertz eşitliği maksimum özgül gelişme hızı (μ_{maks}), lag fazı süresi (λ) parametreleri sağlamaktadır. R² değerleri 0,86-0,99 arasında değişirken RMSE değerleri 0,07-0,80 arasında değişmektedir (Tablo 17). Gompertz modeli değerlendirildiğinde lag fazı süresi (λ) en fazla *C. difficile* ATCC 9689'a uygulanan %1,56 konsantrasyondaki tarçın yağında 147,01 saat olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda uygulanan tarçın yağına *C. difficile* ATCC 9689 sporlarının adaptasyon süresi diğer konsantrasyonlara göre daha uzun olmuştur. Maksimum özgül gelişme hızı (μ_{maks}) -2,8241 ve -0,0666 arasında değişmektedir. Buradaki negatif işareti inaktivasyonu ifade etmektedir. Tüm hücreler inhibe olduğunda 0 olacaktır. %1,56 tarçın yağı varlığında *C. difficile* ATCC 9689'nin inhibe olması için gereken süre daha kısadır.

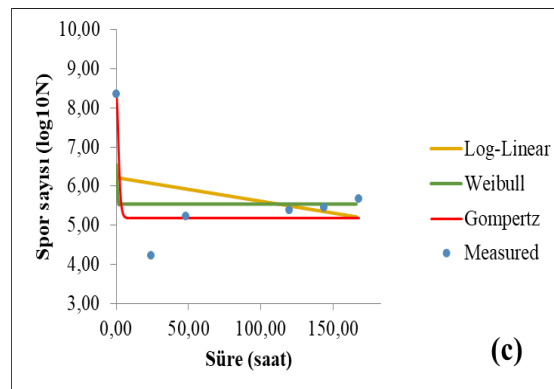
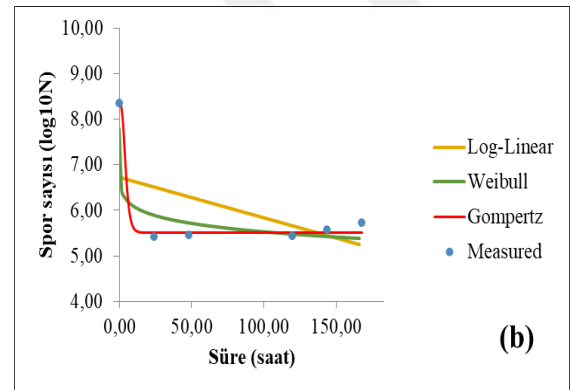
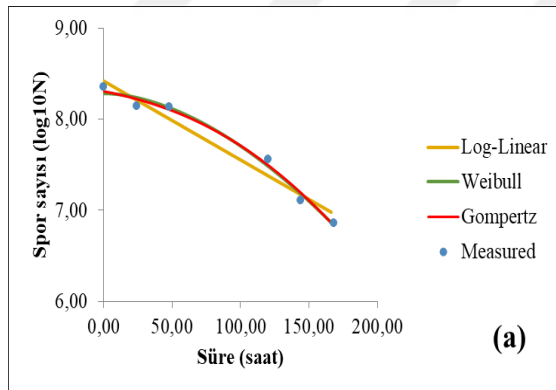
Tablo 17

Sporisidal aktivitenin Gompertz eşitliği ile modellenmesi

	Mikroorganizma Konsantrasyon (%, v/v)	Parametreler			
		$\mu_{maks}(h^{-1})$	λ (saat)	R^2	RMSE
<i>C. difficile</i>	1,56	-0,06	147,01	0,98	0,10
ATCC 9689	3,12	-1,27	1,62	0,98	0,18
	6,24	-2,82	0,17	0,86	0,80
<i>C. difficile</i>	1,56	-0,48	0,32	0,99	0,11
ATCC 9689	3,12	-0,47	0,53	0,99	0,18
ATCC 1870	6,24	-1,64	1,29	0,99	0,07

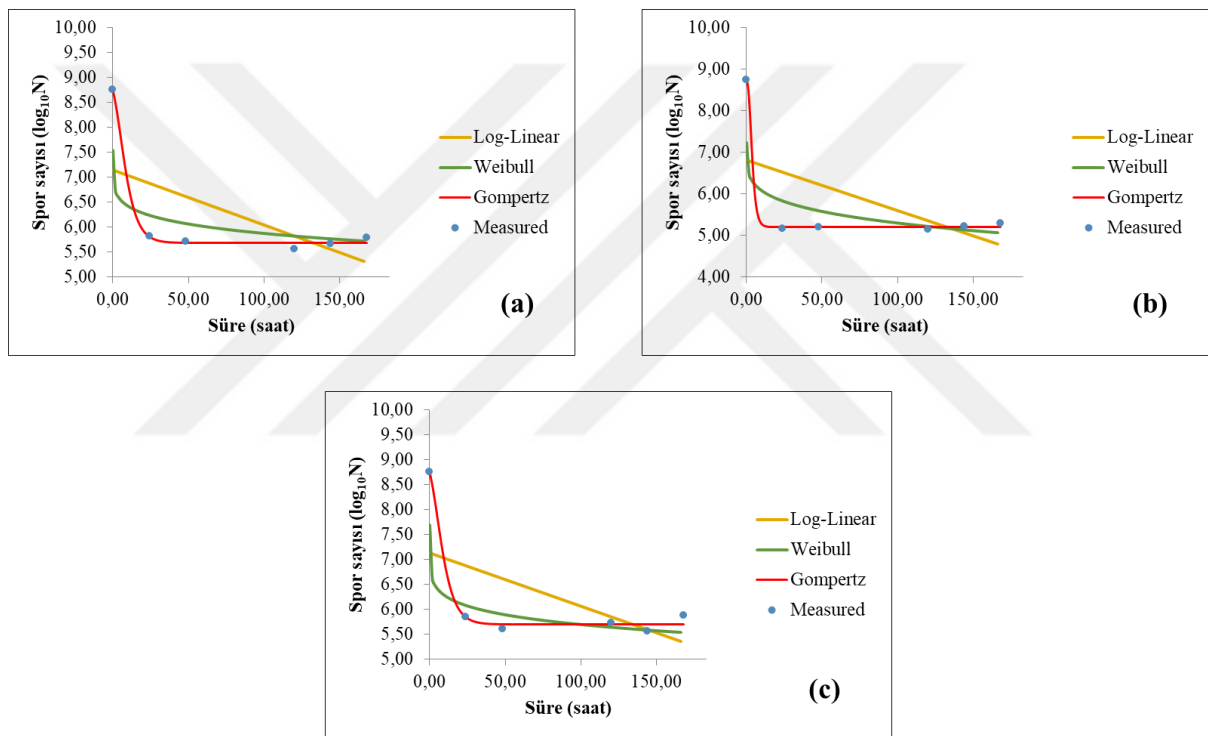
μ_{maks} : Azami özgül büyüme hızı (1/saat) λ : Lag fazı süresi (saat)

R^2 ve RMSE değerlerine göre kıyaslandığında Gompertz eşitliğinin verilerin matematiksel modellemesinde log-linear ve Weibull modellerine göre daha uygun olduğu görülmüştür. Modellerin karşılaştırılması Şekil 32 ve Şekil 33'te gösterilmiştir.



Şekil 32. Tarçın yağının *C. difficile* ATCC 9689 inhibisyonunun model karşılaştırması (a) %1,56 (b) %3,12 (c) %6,24 konsantrasyonları ifade etmektedir.

C. difficile sporlarına karşı antimikrobiyal etki çalışmalarında modelleme yapılan bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Ancak doğal antimikrobiyal maddelerin çeşitli mikroorganizmalara karşı etkisinin araştırıldığı ve matematiksel modellemesinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Gompertz eşitliği maksimum özgül gelişme hızı ve lag fazı süresi gibi parametreleri de sağladığından dolayı en çok uygulanan modeller arasında yer almaktadır.



Şekil 33. Tarçın yağının *C. difficile* ATCC 1870 inhibisyonunun model karşılaştırması (a) %1,56 (b) %3,12 (c) %6,24 konsantrasyonları ifade etmektedir.

Melaleuca armillaris bitki esansiyel yağının farklı pH koşullarının *S. aureus*'a karşı inhibisyon etkisinin Gompertz modeli ile araştırıldığı bir çalışmada (Buldain vd., 2021), ortam asitleştirildiğinde inhibisyon için gereken süre ve esansiyel yağ konsantrasyonunun azaldığını ve pH 7,4'te yağın alt inhibisyon konsantrasyonlarının büyüme hızını ve maksimum popülasyon yoğunluğunu azalttığını ve lag fazını artırdığını ifade etmişlerdir.

Düşük nemli gıdalarda *L. monocytogenes*'in ClO₂ ile inhibisyonunun araştırıldığı çalışmada (Park vd., 2021), su aktivitesi ve ClO₂ konsantrasyonu azaldıkça antimikrobiyal aktivitenin azaldığı ve sonuçların tanımlanmasında modifiye Chick modelinin, Weibull modelinden daha uygun olduğu ifade edilmiştir.

Başka bir çalışmada (Portillo-Ruiz vd., 2012) kekik yağının farklı fraksiyonlarının *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus*'a karşı inhibisyon etkisi modifiye Gompertz modeli ile tanımlanmış ve fraksiyon konsantrasyonu arttıkça inhibisyonun arttığı belirlenmiştir.

Özçakmak ve Gül (2017), kekik, nane ve adaçayı esansiyel yağlarının okratoksinojenik *P. verrucosum*'a karşı etkinliğini Gompertz ve Lojistik modelleri ile tanımlamışlar ve sonuçların modifiye Gompertz modeline daha uygun olduğunu ifade etmişlerdir. 168 saat sonunda %78-81 ölüm gözlemlendiği belirtilmiştir.

4.3.3. Tarçın Esansiyel Yağı-Asetik Asit Kombinasyonunun Sinerjistik Etkisi ve MİK değeri

Tezin önceki kısımlarında yapılan çalışmalarda tarçın esansiyel yağı antibakteriyel özellikleri açısından etkili doğal antimikrobiyal madde olarak seçilmiştir. Aynı zamanda tarçın esansiyel yağı, ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin GRAS listesinde yer almaktadır ve ABD Çevre Koruma Ajansı tarafından toksisite veri gerekliliklerinden muaf tutulduğu ifade edilmektedir (Kong vd., 2007). Ancak tezin daha sonraki kısımlarında yıkama solüsyonu olarak kullanılması planlanan tarçın yağı esansiyel yağının güçlü aroması ve hidrofobik özellikleri sebebiyle uygulamasını kolaylaştırmak amacıyla organik asit olan asetik asit ile birleştirilmesi uygun görülmüştür.

Asetik asit- tarçın esansiyel yağı kombinasyonunun inokülasyon çalışmalarında kullanılacak olan *C. difficile* ATCC 1870 üzerindeki sinerjistik etkisi Dama tahtası yöntemi ile test edilmiştir. %0,19 tarçın yağı varlığında asetik asitin MİK değeri 4 kat azalarak %0,125 olmuştur. %0,125 asetik asit varlığında ise tarçın yağının MİK değeri 16 kat azalarak %0,19 olmuştur. Asetik asit- tarçın yağının *C. difficile* ATCC 1870 için FİK değeri 0,31 olarak hesaplanarak aralarındaki interaksiyon sinerji olarak değerlendirilmiştir.

Kombinasyonun mikrodilüsyon ile belirlenen MİK değeri ise %0,38 tarçın esansiyel yağı+%0,25 asetik asit olarak belirlenmiştir.

4.4. Araştırma 4. Yıkama Solüsyonlarının Marulların Mikrobiyal Yüküne ve Fiziksel/Kimyasal Özelliklerine Etkisi

4.4.1. Marullara İnoküle Edilen *C. difficile*'nin Yıkama Solüsyonları ile Uzaklaştırılması

Çalışmamızda marullara inoküle edilen *C. difficile*'yi inhibe etmede tarçın esansiyel yağı-asetik asit (TEY-AA) karışımının MİK (%0,38 TEY+%0,25 AA (v/v)) değerinde kullanılması etkili olmamıştır (Tablo 18). 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarda kullanılması ise *C. difficile* üzerinde 1,04-1,28 log kob/g seviyesinde azalma sağlamıştır. Hem 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkide hem de uygulama süreleri arasında (5 ve 15 dk) istatistiki anlamda bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$).

NaClO uygulaması ise 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda inoküle edilen *C. difficile*'yi 0,85- 1,89 log kob/g arasında değişen seviyede inhibe etmiştir. 200 ppm NaClO kullanımı ise *C. difficile*'yi tamamen inhibe etmiştir. Antimikrobiyal solüsyon ile yıkama uygulamalarına ek olarak marullara tutunan *C. difficile*'nin su ile uzaklaşıp uzaklaşmadığının belirlenmesi amacıyla inoküle edilen marullar steril içme suyu ile de yıkanmış ve *C. difficile*'yi uzaklaştırmada etkili olmadığı görülmüştür (Şekil 35).

NaClO ve H₂O₂'nin kararsızlığı ve düşük etkinliği, taze ürün dezenfeksiyonunda yaygın kullanımlarını kısıtlamıştır. Aynı zamanda dezenfektanlara dirençli suşlar da rapor edilmiştir (Xu vd., 2021). Klorlu su ile yapılan işlemler taze ürünleri dekontamine etmek için yaygın olarak kullanılsa da Almanya, Hollanda, İsviçre ve Belçika gibi ülkelerde kullanımı fiilen yasak olmasının yanında tüketiciler için sentetik dezenfektanlar endişeye sebep olmaktadır (Alvarez vd., 2015). Klorun doğal organik madde ile reaksiyonunun, trihalometan ve haloasetik asit gibi kanserojen dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşmasına neden olduğu bilinmesiyle birlikte klorun alternatif dezenfektanlarla değiştirilmesi yönünde eğilim olmuştur (Ölmez ve Kretschmar, 2009).

Sağlıklı, güvenli ve doğal gıda üretmeye yönelik artan ilgi göz önüne alındığında bitkilerden elde edilen uçucu yağların kullanılması iyi bir alternatiftir. Taze işlenmiş meyve ve sebzeler dahil olmak üzere gıdalarda raf ömrünü uzatmak, patojen bakterileri azaltmak ve genel kaliteyi iyileştirmek için bitki bazlı antimikrobiyal kullanımı mevcuttur (Alvarez vd., 2015). Esansiyel yağların mikroorganizmalara karşı etki mekanizması, fenolik bileşiklerin sitoplazmik zarındaki proteinler ile etkileşimini içermektedir. Bu durumun iyon sızıntısına ve hücre lizisine sebep olabileceği belirtilmektedir (Artés-Hernández vd., 2017).

Tablo 18

Yıkama yapılan marullarda *C. difficile* sayımı (logkob/g)

Konsantrasyon	Süre (dk)	<i>C. difficile</i>
TEY-AA (MİK)	5	5,05 ^a ±0,01
	15	5,07 ^a ±0,02
TEY-AA (MİKx2)	5	4,20 ^{bc} ±0,04
	15	4,18 ^{bc} ±0,25
TEY-AA (MİKx4)	5	4,32 ^{bc} ±0,07
	15	4,07 ^{cd} ±0,09
NaClO (50 ppm)	5	4,11 ^{bcd} ±0,16
	15	3,78 ^{de} ±0,02
NaClO (100 ppm)	5	4,50 ^b ±0,06
	15	3,46 ^c ±0,04
NaClO (200 ppm)	5	<1
	15	<1
Steril çeşme suyu	5	5,07 ^a ±0,00
	15	5,03 ^a ±0,06
Negatif kontrol*		5,35 ^a ±0,04

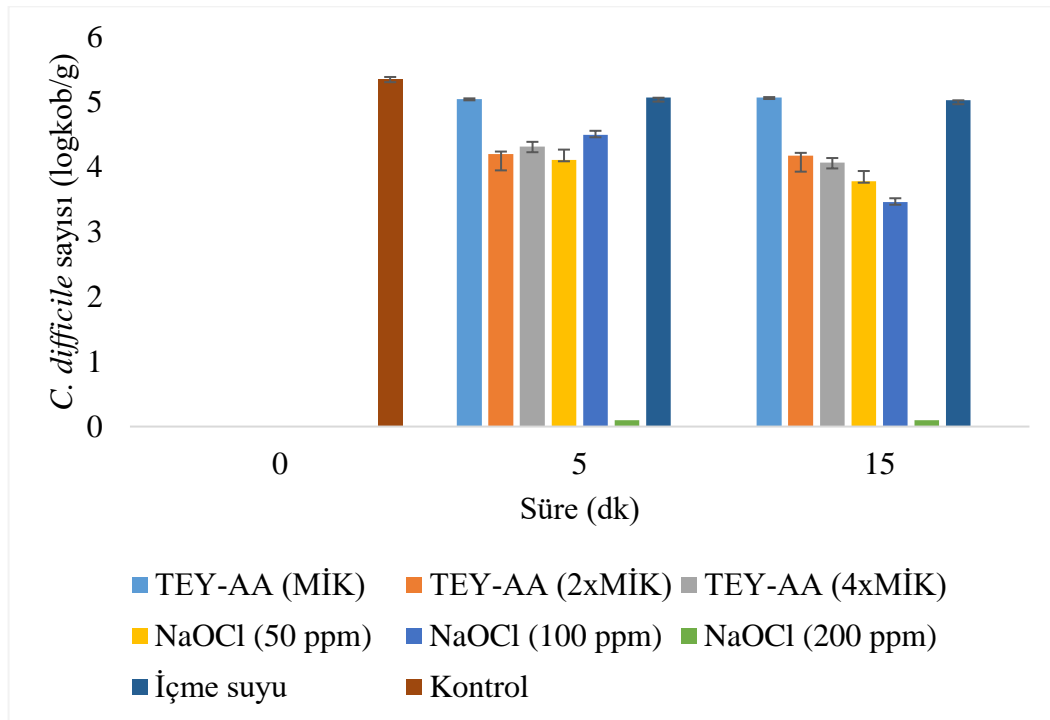
TEY: Tarçın Esansiyel Yağı AA: Asetik asit Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı harfler ile ifade edilen değerler istatistiki olarak önemlidir ($P<0,05$). *Negatif kontrolde yıkama işlemi gerçekleşmemiştir.

Yapılan çalışmalar *in vitro* koşullarda belirlenen esansiyel yağ konsantrasyonlarının, *in vivo* uygulamalarda artırılması gerektiğini göstermiştir (Özdikmenli ve Demirel-Zorba, 2016; Özcan ve Zorba, 2015). Ancak yüksek esansiyel yağ konsantrasyonları uygulandıkları

üründe istenmeyen değişikliklere yol açabilir. Ayrıca lipofilik özelliklerinden dolayı su bazlı yıkama çözeltilerinde uygulamayı zorlaştırmaktadır (Artés-Hernández vd., 2017). Bu sebeple çalışmamızda tarçın esansiyel yağının konsantrasyonunu düşük tutmak ve yıkama uygulamalarındaki uygulanabilirliğin artırılması amacıyla tarçın yağı asetik asit ile birleştirilmiştir.

Zayıf organik asitler, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşme, tekstür hasarı ve mikrobiyal bozulma gibi hasarların önlenmesi için koruyucu amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. NaOCl'nin aksine organik asitler organik moleküller ile etkileşime girdiklerinde toksik veya kanserojen bileşikler üretmezler (Artés-Hernández vd., 2017). Etki mekanizmalarının, osmotik stres, proton hareket kuvvetinin bozulması ve makromoleküllerin sentezinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Artés-Hernández vd., 2017). Birçok organik asit arasında asetik asit, ucuzdur ve kolayca temin edilebilmektedir (Park vd., 2021).

Bu çalışmada da oluşturan tarçın esansiyel yağı-asetik asit yıkama solüsyonunun in vitro koşullarda belirlenen MİK değeri *C. difficile* inaktivasyonunda yeterli olmamıştır (Şekil 34). 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarda ise *C. difficile* inhibisyonu sağlanmıştır.



Şekil 34. Yıkamanın marullara inoküle edile *C. difficile* üzerindeki etkisi (logkob/g)
Kontrol grubunda yıkama gerçekleştirilmemiştir.

Yıkama solüsyonları ile sebzelerden *C. difficile*'nin uzaklaştırılması ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Kerr (2009) sporlu bir bakteri olan *Bacillus cereus*'u kavun yaprağına ve ıspanaklara spot inokülasyon ile inoküle etmiş ve NaOCl, HCl ve H₂O₂'nin *Bacillus* inaktivasyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yapraklar inokülasyonun ardından 30 dk kurutulmuş ardından antimikrobiyal bileşikler yapraklara püskürtülmüştür. En yüksek inaktivasyonun NaOCl (%6, v/v) ve HCl (%20, v/v) ile ıspanaklarda 10 dakikada 5,84 log/g azalma olarak saptandığını, kavun yapraklarında ise NaOCl (%6, v/v)'nin *B. cereus* sporlarını 5,15 log/g azalttığı ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 200 ppm (\cong %5,33) NaOCl marullara inoküle edilen *C. difficile*'yi tamamen inhibe ederek yaklaşık 5 log/g azalma sağlamıştır.

4.4.2. Yıkamanın Marullardaki TMAB ve Enterobacterales Yüküne Etkisi

Hasat, nakliye ve satış sırasındaki zayıf agronomik (yetiştirme teknikleri) ve hijyen uygulamaları sebebiyle sebzeler patojenler ile kontamine olabilmektedir (Ndlovu, 2020). Sebzelerin mikrobiyolojik kontaminasyonunun değerlendirilmesi için, genel kirlilik göstergeleri olarak toplam mezofilik aerobik bakteri ve Enterobacterales yükü önemlidir (Kłapeć vd., 2016).

TEY-AA uygulamasının tüm konsantrasyonlarında marullarda toplam mezofilik aerobik sayısında bir azalma sağlanmış olup 0,75 ile 3,02 log kob/g arasında değişmektedir (Tablo 19). TEY-AA kombinasyonunda konsantrasyonların uygulanma süreleri arasında istatistiki anlamda bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). En fazla inhibisyon 4xMİK konsantrasyonda 15 dakika yıkamada 3,02 log kob/g olarak belirlenmiştir (Şekil 35). Benzer şekilde Hamad vd., (2013) tarafından yapılan çalışmada, marulları %5 asetik asit varlığında 2 dk bekletmenin aerobik mezofilik bakteri, koliform ve mayalara karşı 3 log'a kadar azalma sağladığı belirtilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda 4xMİK konsantrasyondaki TEY-AA kombinasyonunda asetik asit daha düşük konsantrasyonda (%1) benzer inhibisyon etkiyi göstermiştir.

50 ppm konsantrasyonda 5 dakika yıkama dışındaki tüm NaClO uygulamalarında toplam mezofilik aerobik yükün tamamı inhibe olmuştur. 50 ppm NaClO'nun 5 dakika uygulaması ise 3,77 log kob/g azalma sağlayarak TEY-AA uygulamasından daha etkin olmuştur (Şekil 35). Kışniş, lahana ve marula uygulanan %3'lük ev tipi klor (%5,2 sodyum hipoklorit) veya %30 ev tipi sirke (%5 asetik asit) ile yıkama uygulamasının mikrobiyal yükü elimine ettiği ifade edilmiştir (Bautista ve Thiagarajan., 2019). Bu farkın çalışmamızda kullanılan NaOCl ve asetik asit konsantrasyonlarının daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

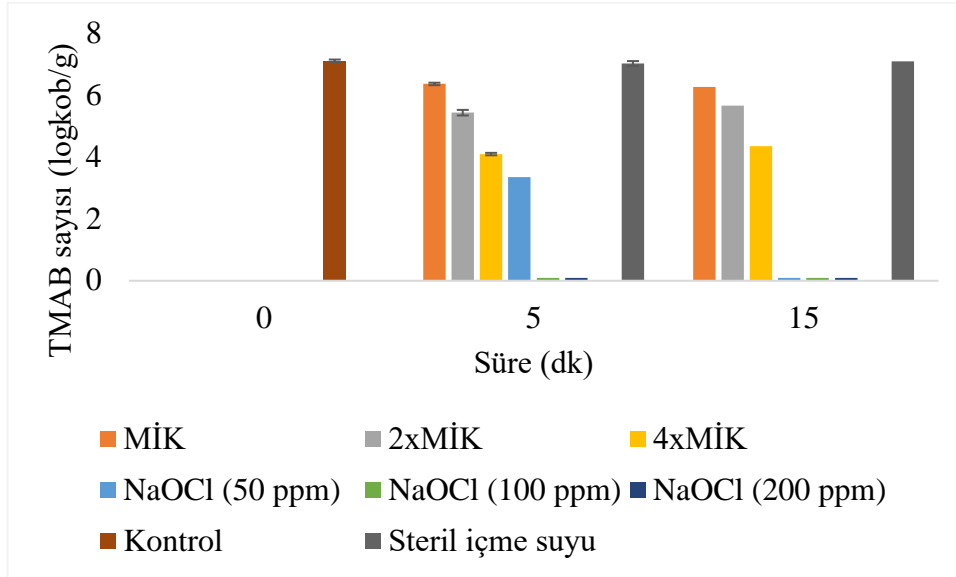
Steril içme suyu ile yıkamada toplam mikrobiyal yük uzaklaşmamıştır. Benzer şekilde Temiz vd., (2011), marul, maydanoz ve rokanın mikrobiyal yükünün çeşme suyu ile uzaklaştırılmadığını ifade etmişlerdir. Ayrıca toplam mezofilik bakteri ve koliform yükünü azaltmada klor (200 mg/L) ve asetik asit (%0,25 v/v) arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığını belirtmişlerdir.

Tablo 19

Yıkama yapılan marullarda toplam mezofilik aerobik bakteri ve Enterobacterales sayımı (\log_{10} kob/g)

Konsantrasyon	Süre (dk)	TMAB	Enterobacterales
TEY-AA	5	6,37 ^{bc} ±0,00	4,28 ^c ±0,04
(MİK)	15	6,28 ^{cd} ±0,04	4,35 ^c ±0,01
TEY-AA	5	5,44 ^e ±0,08	<1
(2xMİK)	15	5,67 ^{de} ±0,09	<1
TEY-AA	5	4,10 ^f ±0,09	<1
(4xMİK)	15	4,35 ^f ±0,04	<1
NaClO	5	3,35 ^g ±0,49	<1
(50 ppm)	15	<1	<1
NaClO	5	<1	<1
(100 ppm)	15	<1	<1
NaClO	5	<1	<1
(200 ppm)	15	<1	<1
Steril çeşme suyu	5	7,03 ^{ab} ±0,04	5,30 ^b ±0,07
	15	7,11 ^{ab} ±0,08	5,21 ^b ±0,05
Negatif kontrol*		7,12 ^a ±0,04	5,83 ^a ±0,02

Bencardino vd., (2018), marullara 5 farklı (su, tuzlu su (4g/500mL), bikarbonatlı su (8g/500mL), sirkeli su (10 mL/500mL), klorin bazlı dezenfektan (10 mL/500mL) yıkama solüsyonunu 15 ve 30 dk uygulamışlardır. 30 dk sirke ve 15 dk dezenfektan ile yıkamanın marullarda önemli bir mikrobiyal azalmayı sağladığını belirtmişlerdir.

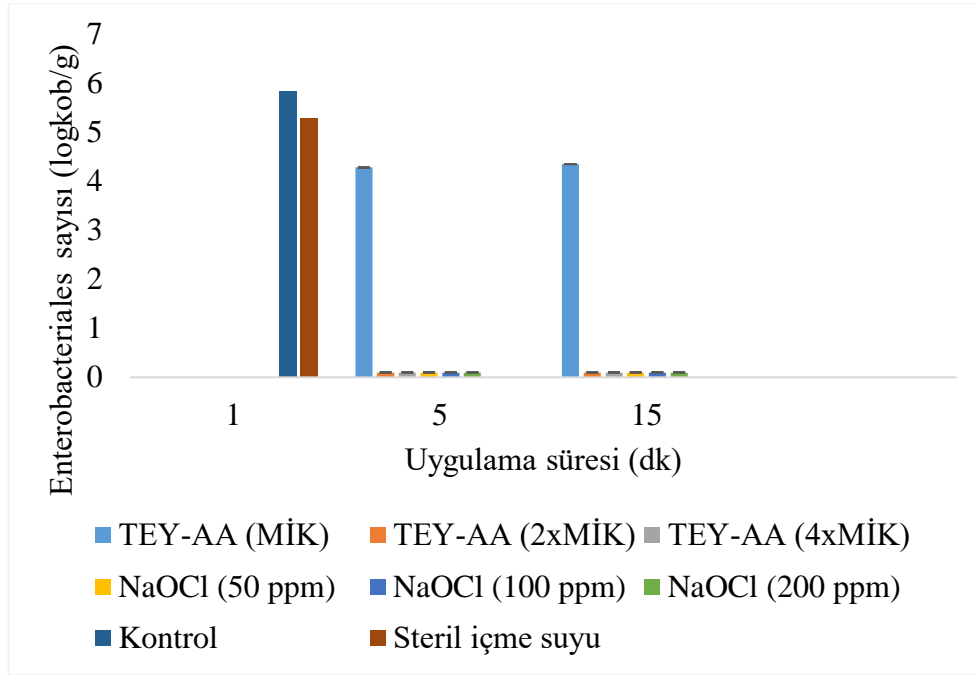


Şekil 35. Yıkamanın marullardaki toplam mikrobiyal yüke etkisi ($\log_{10}\text{kob/g}$). Kontrol grubunda yıkama gerçekleşmemiştir.

2016 yılında sonra Enterobacterales takımının aralarında Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Peptobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae ve Budviciaceae olduğu 7 aileye ayrılması önerilmiştir (Adeolu vd., 2016). *Escherichia*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* gibi patojenik cinsler, Enterobacteriaceae familyasında yer almaktadır. (Adeolu vd., 2016).

TEY-AA'nın MİK değeri dışındaki tüm uygulamalarda Enterobacterales yükünün tamamı inhibe olmuştur (Tablo 19). MİK değerinde ise 5 ve 15 dk sonunda sırasıyla 1,48 ve 1,55 logkob/g azalma saptanmıştır. Steril içme suyu ile yıkamanın Enterobacterales yükünde azalma sağlamadığı tespit edilmiştir. NaOCl'nin tüm konsantrasyonlarında ve sürelerinde Enterobacterales yükü tamamen inhibe edilmiştir (Şekil 36). Benzer şekilde, Carella (2014) kekik esansiyel yağı ve asetik asit arasında sinerjistik bir aktivite belirlemiş ve %1 asetik asit- %0,02 kekik esansiyel yağı karışımının marullara spot aşılınmış *Salmonella*'yı 10 dk içinde 2,41 log/g azaltarak 50 ppm konsantrasyondaki klordan (1,83 log/g) önemli derecede farklı olmadığını ifade etmiştir. Ijabadeniyi vd., (2020) kekik yağı (%0,1/v,v) ve asetik asit (%0,3/v,v) kombinasyonunun maruldaki *E. coli* ve *L. monocytogenes*'in tam inhibisyonunu sağladığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise çeşme suyu, tuzlu su, sirkeli su ve klorlu su ile yıkanan salatalık, ıspanak ve marulun mikrobiyal yükünde 1-2 log azalma sağlandığı

ve yükün uzaklaştırılmasında çeşme suyunun etkili olamayıp klor veya sirkenin uygulanabilir olduğu ifade edilmiştir (Ajayi vd, 2017).



Şekil 36. Yıkamanın marullardaki Enterobacteriales yüküne etkisi (log kob/g)
Kontrol grubunda yıkama gerçekleşmemiştir.

Park vd., (2011), marullara inoküle edilen *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*'in %1-2 konsantrasyonlardaki organik asitler ile inhibisyonunu araştırmışlardır. Uygulama süresi ve konsantrasyon arttıkça inhibisyonun arttığını belirlemişler ve propiyonik asitin (0,93-1,52 log), asetik asitin (1,13-1,74 log), laktik asitin (1,87-2,54 log), malik asitin (2,32-2,98 log) ve sitrik asitin (1,85-2,86) log azalma sağladığını belirtmişlerdir.

Dezenfektanın etkinliği yıkama suyunun fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra dezenfektanın türü, konsantrasyon, temas süresi, sıcaklık, pH, gibi parametrelere göre değişebilmektedir (Banach vd., 2015). Farklı antimikrobiyal yıkama uygulamalarının (elma sirkesi, beyaz sirke, klorlu su, limon suyu ürünü), farklı sıcaklıklarda (4 ve 21°C) ve farklı maruziyet sürelerinde (0, 1, 5 ve 10 dk) marullara inoküle edilen *E. coli* inhibisyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada (Vijayakumar ve Wolf-Hall, 2002), en yüksek inhibisyon %35 beyaz sirkede (%1,9 asetik asit) çalkalamalı bir şekilde 5 dakikada, çalkalamasız bir

şekilde 10 dakikada 5log azalma saptanmıştır. Toplam aerobik yük ise, çalkalamalı bir şekilde 10 dakika uygulanarak 2log azalmıştır.

Tarçın yağının marullara inoküle edilen *Salmonella* üzerinde etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada (Todd vd., 2013), %0,3 ve %0,5 (v/v) tarçın esansiyel yağına 2 dk daldırılan ve 4 ve 8°C'de 3 gün depolanan marullarda *Salmonella*'nın 3 gün boyunca geri kazanılmadığı ve depolama sıcaklığının *Salmonella* inhibisyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Rossi vd., (2022), NaOCl (%2) ve tarçın esansiyel yağının (%0,5) 8°C'de depolamada 48 saat sonunda marul yüzeyinde mikrobiyal yükü azalttığını ve inoküle edilen *Salmonella*'yı NaOCl ve tarçın esansiyel yağının sırasıyla 2,7 ve 0,44-1,00 logkob/g azalttığını, sodyum bikarbonatın (15mg/mL) ise etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Akbaş ve Ölmez (2007), marullara inoküle ettikleri *E. coli* ve *L. monocytogenes*'i organik asitler ve klor (%13, v/v) ile 2 ve 5 dk daldırma ile uzaklaştırmaya çalışmışlar ve %0,5 sitrik asit veya %0,5 laktik asit solüsyonlarının 2 dk uygulanmasının klorin kadar etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

12 farklı meyve ve 10 farklı sebzenin steril su, tuzlu su (900 ppm) ve sirke (%4,5 asetik asit) ile yıkandığı bir çalışmada (Rahman vd., 2021), en yüksek mikrobiyal azalmanın sirke ile sağlandığı ve sebzelerdeki toplam canlı yükünü 2,31 log azalttığını ifade etmişlerdir.

Organik asit ve esansiyel yağ kombinasyonlarının sebzelerin dekontaminasyonunda araştırıldığı çalışmalar kısıtlı olsa da farklı bitki esansiyel yağlarının sebzelerden gıda patojenlerinin uzaklaştırılması ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada (Irkin vd., 2021), taze limon kabuğu ekstraktı ve kuru nane esansiyel yağı solüsyonlarında daldırma yöntemiyle dezenfekte edilen marul, maydanoz ve dereotu karışımının toplam mikrobiyal yükünün nane esansiyel yağı ile 7,56 log kob/g azaldığı ve sebze karışımına inoküle edilen *E. coli* ATCC 25933'ün limon kabuğu ekstraktı ile 7,37 log kob/g azaldığı ifade edilmiştir.

García (2019), beyaz hardal esansiyel yağının (%0,84, v/v) TSB besiyerinde *E. coli* popülasyonunda 2,7-2,9 log kob azaldığını, marullara inoküle edilen *E. coli*'nin %1 hardal esansiyel yağı ve 150 ppm sodyum hipoklorit ile 2 log azalma sağladığını ve böylelikle beyaz hardal esansiyel yağının klor çözeltilerine alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Marul, salatalık ve maydanoz üzerinde *L. monocytogenes*'in yıkama ile uzaklaştırılmaya çalışıldığı bir çalışmada (Nastou vd., 2012), asetik asitle dekontaminasyonda (%2,0, v/v'ye kadar) en yüksek gözlenen azalmanın 2,6 log kob/g olduğunu ve yıkama etkinliğini belirleyen en önemli faktörün sebzenin kendisi olduğunu, salatalığa inoküle edilen *L. monocytogenes*'in yıkama işleminde yapraklı sebzelere göre daha dirençli olduğunu ifade etmişlerdir.

Özcan ve Zorba (2015) marul, maydanoz ve dereotu karışımına *L. monocytogenes* inoküle etmişler ve musluk suyu, klorlu su (150 ppm), limon esansiyel yağı (%1, v/v) ve tarçın esansiyel yağı (%2, v/v) ile daldırma yöntemiyle 5 dakika yıkama işlemi uygulamışlardır. İnoküle edilen *L. monocytogenes*'in limon esansiyel yağı ile 4 log ve tarçın esansiyel yağı ile 2 log azaldığını ifade etmişlerdir.

4.4.3. Yıkama Solüsyonlarının Marulların pH ve SÇKM Özelliklerine Etkisi

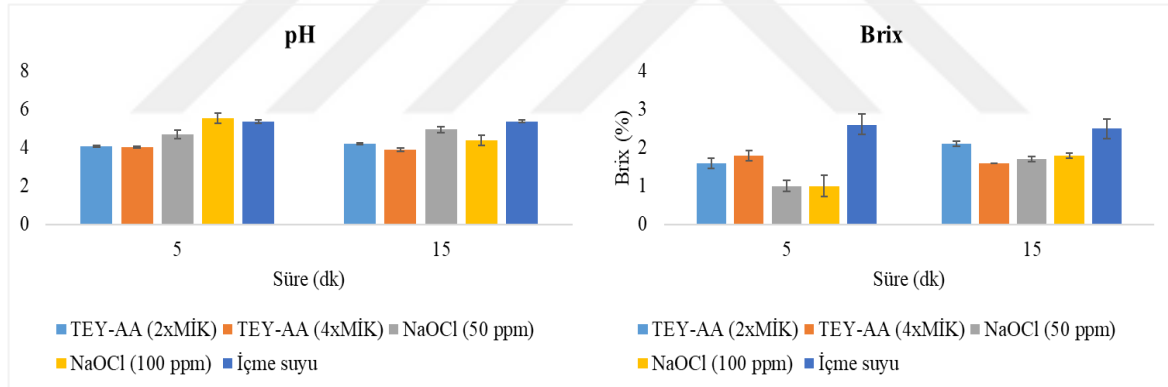
TEY-AA solüsyonu diğer yıkama uygulamalarından daha asidik olduğundan TEY-AA ile yıkanan örneklerin pH değerleri daha düşük ölçülmüştür. Aynı zamanda konsantrasyon ve maruziyet süresi arttıkça pH değeri düşmüştür (Tablo 20).

Marulların SÇKM içerikleri ise, tüm yıkamalarda konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik göstermemiştir. İçme suyu ile yıkanan marulların benzer SÇKM içeriğine sahip marullar ise 2xMİK konsantrasyonda 15 dk yıkanan marullar olmuştur (Şekil 37).

Tablo 20: Yıkama solüsyonlarının marulların pH ve SÇKM özelliklerine etkisi

Yıkama	Konsantrasyon	Süre (dk)	pH	SÇKM
TEY-AA	2xMİK	5	4,09±0,04 ^{cd}	1,6±0,14 ^{bc}
		15	4,20±0,04 ^{cd}	2,1±0,07 ^{ab}
	4xMİK	5	4,05±0,04 ^d	1,8±0,14 ^b
		15	3,92±0,09 ^d	1,6±0,00 ^{bc}
NaOCl	50 ppm	5	4,71±0,21 ^{bc}	1,0±0,14 ^c
		15	4,96±0,15 ^{ab}	1,7±0,07 ^b
	100 ppm	5	5,56±0,27 ^a	1,0±0,28 ^c
		15	4,39±0,26 ^{bcd}	1,8±0,07 ^b
İçme suyu		5	5,37±0,08 ^a	2,6±0,28 ^a
		15	5,38±0,06 ^a	2,5±0,25 ^a

Sonuçlar ortalama± standart hata olarak verilmiştir. Sütun üzerinde farklı harf ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 37. Yıkanan marulların pH ve SÇKM değişimleri

4.4.4. Yıkama Solüsyonlarının Marulların Renk ve Tekstür Özelliklerine Etkisi

Meyve ve sebzelere uygulanacak yeni sanitasyon uygulamalarında, uygulamanın sadece mikrobiyal iyileşmeyi sağlaması değil, aynı zamanda ürünlerin fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerinin de korunması beklenmektedir (Coswosck vd., 2020).

Marulda kesme nedeniyle dokunun kahverengileşmesini ifade eden esmerleşme ile etilene maruz kalma ile meydana gelen kızıl lekelenme olarak adlandırılan iki tür renk

bozulması gözlenir. Enzimatik ve enzimatik olmayan fenolik bileşiklerle reaksiyonlar bitki dokusunda kahverengi pigmentler üretmektedir (Witkowska, 2013).

Taze kesilmiş sebzeler bitki dokusunun yaralanmasına sebep olmaktadır. Bu durum kalite bozulmasına sebep olan bir dizi metabolik ve enzimatik aktiviteyi başlatmakta ve tekstür kaybı, kötü tat ve koku oluşumu, renk kaybı gibi istenmeyen değişikliklere sebep olmaktadır. Taze kesilmiş sebzelerdeki bu reaksiyonların ürünün raf ömrünü kısalttığı ifade edilmektedir (Giannakourou vd., 2021).

Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde yıkama işlemi uygulanan marullara ait L, a, b değerleri Tablo 21’de verilmiştir.

Tablo 21
Yıkanan marullardaki renk değişimi

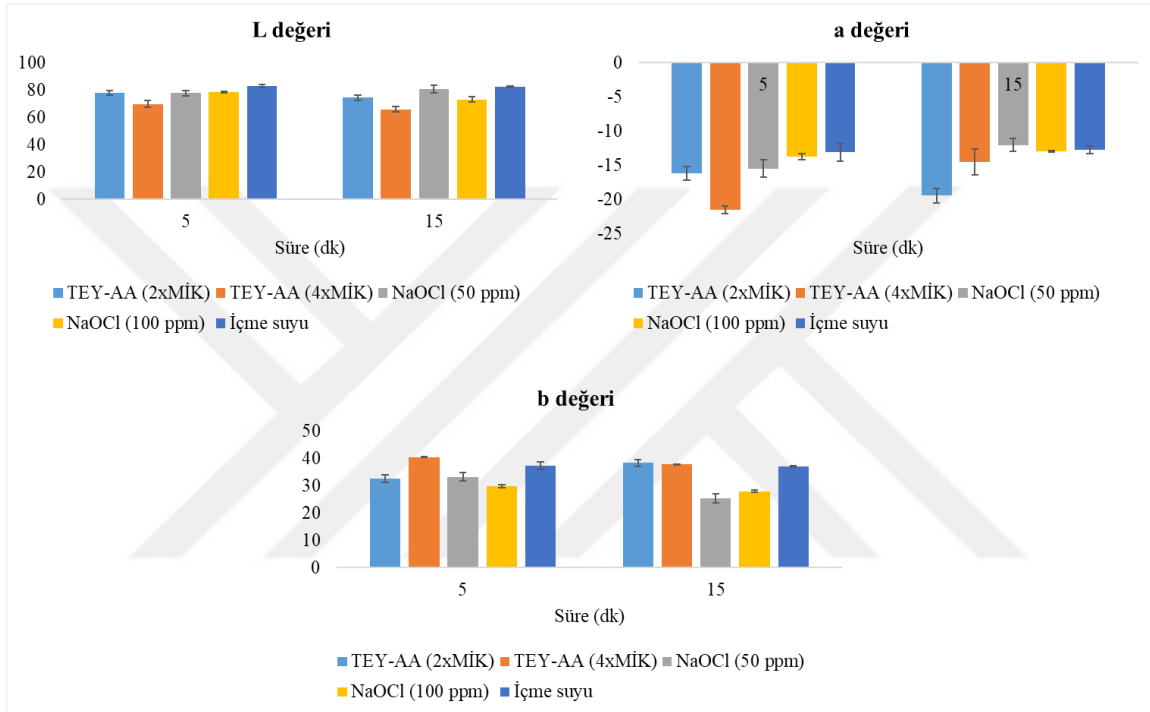
	Konsantrasyon	Süre (dk)	L	a	b
TEY-AA	2xMİK	5	78,03±1,50 ^{AB}	-16,12±1,00 ^{ABC}	32,61±1,31 ^{BCD}
		15	74,41±1,76 ^{ABC}	-19,39±1,04 ^{AB}	38,40±1,25 ^{AB}
	4xMİK	5	69,82±2,42 ^{BC}	-21,50±0,53 ^A	40,58±0,25 ^A
		15	65,91±1,93 ^C	-14,50±1,93 ^{ABC}	37,89±0,03 ^{AB}
NaOCl	50 ppm	5	77,71±1,87 ^{AB}	-15,45±1,30 ^{ABC}	33,33±1,47 ^{BCD}
		15	80,62±2,82 ^B	-12,04±0,94 ^C	25,48±1,73 ^E
	100 ppm	5	78,30±0,63 ^{AB}	-13,73±0,48 ^{ABC}	29,85±0,55 ^{CDE}
		15	73,21±1,78 ^{ABC}	-12,95±0,15 ^{BC}	28,04±0,52 ^{DE}
İçme suyu		5	82,81±1,11 ^A	-13,09±1,30 ^{BC}	37,47±1,36 ^{AB}
		15	82,23±0,52 ^A	-12,72±0,57 ^{BC}	37,09±0,37 ^{ABC}

Sonuçlar ortalama± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

Tablodan da görüldüğü gibi parlaklık seviyesini gösteren ve 0-100 arasında değer alan ‘L’ değeri 4xMİK ile 15 dk yıkamada diğerlerinden önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Tablo 21, Şekil 38). Bu konsantrasyonda yıkamada marulların parlaklığı düşmüştür. 2xMİK ile yıkanan örneklerde ise, L değeri içme suyu ile yıkananlardan istatistiki olarak farklı değildir ($P>0,05$). Marulların yeşil renk seviyesini ifade eden ‘a’ değerleri arasında ise yıkama uygulamaları arasında fark gözlenmemiştir. ‘b’ değerinde ise TEY-AA’nın

konsantrasyonları ve uygulanan süreler arasında fark gözlenmemesinin yanında içme suyu ile yıkanan örneklerin b değerleri ile de aralarında fark yoktur ($P>0,05$).

Marulların tarçın yağı (%0,5/ v,v) ile yıkandığı başka bir çalışmada da (Rossi vd., 2022) 48 saat sonunda yaprakların renk parametrelerinde önemli bir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir.



Şekil 38. Yıkama yapılan marullarda renk değişimi

Gıdalardaki ‘sertlik’ yapıda bozulma sağlamak için uygulanması gereken kuvvettir. Duyusal anlamda azı dişleri arasında gıdaya uygulanan güç iken, tekstürel anlamda ise ilk sıkıştırmanın bitip geri çekilmenin başladığı noktaya karşılık gelmektedir (Tiryaki, 2021).

Yıkama solüsyonlarının marulların tekstürel özelliğine etkisi değerlendirildiğinde, 4xMİK konsantrasyondaki TEY-AA ile 15 dakika yıkama dışındaki tüm yıkamalarda süreler arasında farklılık saptanmamıştır (Tablo 22). İçme suyu ile yıkamaya kıyasla en benzer tekstürel özellik 4xMİK TEY-AA’nın 15 dk uygulamasında görülüyor gibi olsa da bu konsantrasyon ve süre, marullarda fark edilebilir seviyede yumuşama sağlamıştır ve üründe deformasyon oluşabilmesi için daha fazla kuvvet uygulanması gerekmiştir.

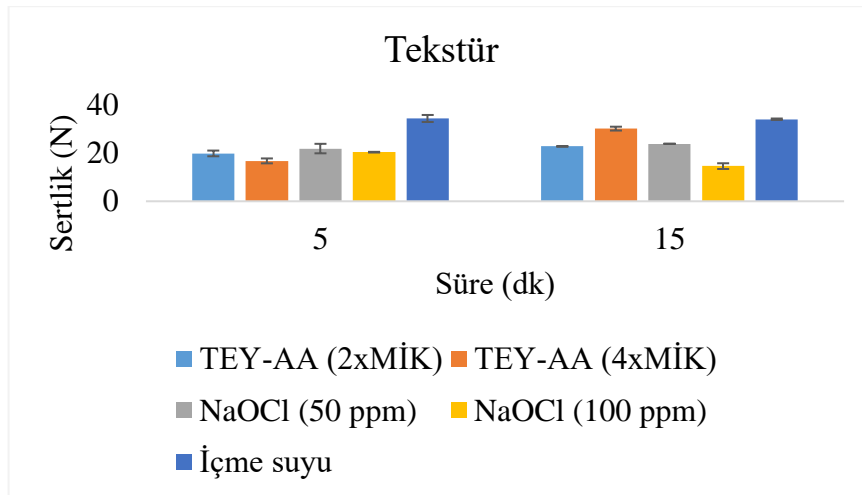
Tablo 22

Yıkanan marulların tekstüründeki değişimler

	Konsantrasyon	Süre (dk)	Tekstür (N)
TEY-AA	2xMİK	5	19,95±1,19 ^{BCD}
		15	22,88±0,12 ^B
	4xMİK	5	16,84±1,02 ^{CD}
		15	30,30±0,80 ^A
NaOCl	50 ppm	5	21,98±1,98 ^{BC}
		15	23,97±0,01 ^B
	100 ppm	5	20,47±0,14 ^{BC}
		15	14,66±1,19 ^B
İçme suyu		5	34,53±1,46 ^A
		15	34,22±0,30 ^A

Sonuçlar ortalama± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile gösterilen değerleri birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

İçme suyu ile yıkanan örneklerdeki kuvvet ise, ürünün gevrekliğine uygulanan kuvvet olmuştur. 2xMİK TEY-AA ve 50/100 ppm NaOCl ile yıkanan örneklerde ise tekstürel bir farklılık yoktur. Sonuç olarak içme suyu ile yıkananlardaki gevreklik/tazelik hissi düşünüldüğünde NaOCl ile yıkama ve 2xMİK TEY-AA ile yıkama tekstürde kayba yol açmıştır (Şekil 39). Ancak bu kayıp ürünün kabul edilebilirliğini olumsuz yönde etkileyecek seviyede değildir. Yıkanan marulların fiziksel görünümleri Şekil 40'da gösterilmiştir.



Şekil 39. Yıkamanın marullardaki tekstüre etkisi



Şekil 40. Yıkanan marulların fiziksel görüntüleri

4.4.5. Yıkama Solüsyonlarının Marulların Toplam Fenolik Madde İçeriğine Etkisi

Sebze işleme, özellikle kesme işlemleri sırasındaki mekanik ve fiziksel stresler, dokularda çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri ortaya çıkaran bir yara sinyali oluşturur. Yara kaynaklı değişiklikler arasında nem kaybı, yüksek solunum, etilen üretimi ve fenolik bileşiklerin birikmesine ve ardından doku esmerleşmesine neden olan fenilpropanoid metabolizmasının aktivasyonu yer almaktadır (Baur vd., 2004).

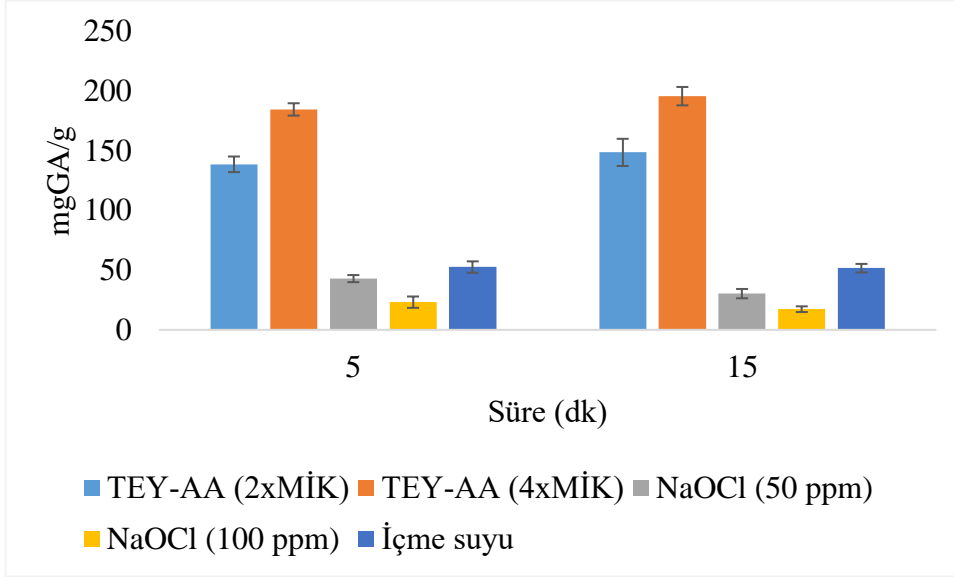
TEY-AA ile yıkamada konsantrasyon arttıkça toplam fenol içeriği artmıştır (Tablo 23). Bu durumun marulun toplam fenol içeriğine ek olarak yıkama sonrası kalıntı olarak kalan yıkama solüsyonundan gelen toplam fenolik içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. NaOCl ile yıkamada ise, konsantrasyon arttıkça toplam fenol miktarı azalmıştır. Uygulama süreleri açısından ise istatistiksel açıdan önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 41).

Tablo 23

Yıkama solüsyonlarının marulların toplam fenol içeriğine etkisi

	Konsantrasyon	Süre (dk)	Toplam Fenolik madde (mgGA/100g)
TEY-AA	2xMİK	5	138,74±6,54 ^B
		15	148,74±11,40 ^B
	4xMİK	5	184,76±5,17 ^A
		15	195,88±7,72 ^A
NaOCl	50 ppm	5	42,94±2,97 ^{CD}
		15	30,33±3,91 ^{CD}
	100 ppm	5	23,19±4,75 ^D
		15	17,31±2,38 ^D
İçme suyu	5	52,62±4,78 ^C	
	15	51,69±3,56 ^C	

Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Sütun üzerinde farklı harfler ile gösterilen değerler birbirinden farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 41: Yıkamanın marulların toplam fenol içeriğine etkisi

4.5. Araştırma 5. Modifiye Atmosfer Paketlenen Marulların Depolama Boyunca Mikrobiyal Yükündeki ve Fiziksel/Kimyasal Özelliklerindeki Değişim

4.5.1. Depolama Boyunca Marullara İnoküle Edilen *C. difficile*'nin Değişimi

Modifiye atmosfer paketlemenin (MAP), tüketiciye taze ürün sağlamak, ürünün raf ömrünü uzatmak, sebzelerin fiziksel özelliklerinin korunmasını sağlamak ve solunum, terleme, oksidatif stres ve mikroorganizma gelişimini sınırlandırmak için kullanışlı olduğu ifade edilmektedir (Firouz vd., 2021). Taze yapraklı sebzeler, uygun olmayan koşullarda depolandıklarında raf ömrü kısa olan ürünlerdir. Depolama sıcaklığı ve nem bu ürünlerin kalitesini ve güvenliğini etkileyen önemli faktörlerdir. (Nousiainen vd., 2016). Taze meyve ve sebzeler hasattan sonra halen metabolik aktivitelerini devam ettirdiklerinden, MAP'ın etkin olması sadece polimer filmlerin O₂-CO₂ geçirgenliğine değil, aynı zamanda ürünün solunum aktivitesine de bağlıdır. Bu açıdan bakıldığında meyve sebzeğe uygulanan MAP'ın, et ürünlerine uygulanan MAP'tan daha karmaşık olduğu düşünülmektedir (Zhuang vd., 2014).

Solunum hızı, hasat sonrası hücredeki metabolik süreçlerin hızı olarak tanımlanmaktadır. Solunum asıl olarak, karbonhidratların enerjiye dönüştürüldüğü katabolik bir süreçtir. Solunum genellikle aerobiktir, ancak daha az enerji ve potansiyel olarak toksik bileşikler üreterek anaerobik solunum da meydana gelebilmektedir (Løkke, 2012).

Normal şartlar altında meyve sebzelerin solunum hızını azaltmak için O₂ konsantrasyonu %1-5 arasında tutulmaktadır. Böylelikle ürünü meydana getiren kompleks substratların oksidatif parçalanması geciktirilerek, ürünün raf ömrünün uzaması sağlanmaktadır. Ancak <%1 seviyesinde O₂ varlığında anaerobik solunum meydana gelebilmektedir. Bu durum üründe kötü koku ve tada sebep olmasının yanında anaerobik patojen mikroorganizmaların gelişmesine sebep olabilmektedir (Farber vd., 2003).

Mikrobiyal gelişme için aeroblar için olan %21 ve anaeroblar için olan %0-2 optimum O₂ konsantrasyonu aşıldığında ‘oksijen şoku’ uygulanarak aerobik ve anaerobik mikrobiyal gelişmenin durdurulduğu bulunmuştur. Ancak yüksek O₂’nin (%80-90) *E. coli* ve *L. monocytogenes*’in gelişimini desteklediği bilinmektedir (Farber vd., 2003).

Çalışmamızda 2xMİK konsantrasyondaki TEY-AA ile 5 dk, 50 ppm konsantrasyondaki NaOCl ile 15 dk ve kontrol grubu olan çeşme suyu ile 5 dk yıkanan marullar polipropilen (PP) sızdırmaz kaplarda Pet EVOH PP üst filmi kullanılarak %2 CO₂ %5 O₂ ve %93 N₂ gaz karışımı ile paketlenmiştir. Paketler 4 ve 10°C’de 10 gün boyunca depolanmıştır. Depolama boyunca paketlerin içerisindeki O₂ ve CO₂ gazı değişimleri Tablo 24 ve Tablo 25’de verilmiştir.

Tablo 24

İnoküle edilen ve MAP yapılan marullarda depolamaya bağlı CO₂ değişimi

		CO ₂ konsantrasyonu (%)				
	Sıcaklık (°C)	1.gün	3.gün	5. gün	7. gün	10.gün
TEY-AA	4	1,82±0,13 ^{Da}	1,87±0,18 ^{Ea}	2,30±0,34 ^{Ba}	1,90±0,05 ^{Da}	1,92±0,33 ^{Da}
	10	2,10±0,17 ^{CDab}	1,75±0,08 ^{Eb}	2,87±0,49 ^{Ba}	1,67±0,04 ^{Db}	2,10±0,05 ^{Dab}
NaOCl	4	2,22±0,04 ^{BCDe}	2,97±0,02 ^{Dd}	3,35±0,08 ^{Bc}	4,30±0,05 ^{Cb}	4,95±0,14 ^{Ca}
	10	2,62±0,06 ^{ABe}	4,27±0,11 ^{Bd}	5,40±0,10 ^{Ac}	6,82±0,18 ^{Bb}	7,87±0,17 ^{Aa}
Kontrol	4	2,32±0,09 ^{BCd}	3,70±0,04 ^{Cc}	4,60±0,17 ^{Ab}	4,85±0,02 ^{Cb}	6,42±0,06 ^{Ba}
	10	2,97±0,08 ^{Ac}	5,12±0,11 ^{Ab}	5,72±0,22 ^{Ab}	8,62±0,22 ^{Aa}	8,70±0,22 ^{Aa}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Tablo 25

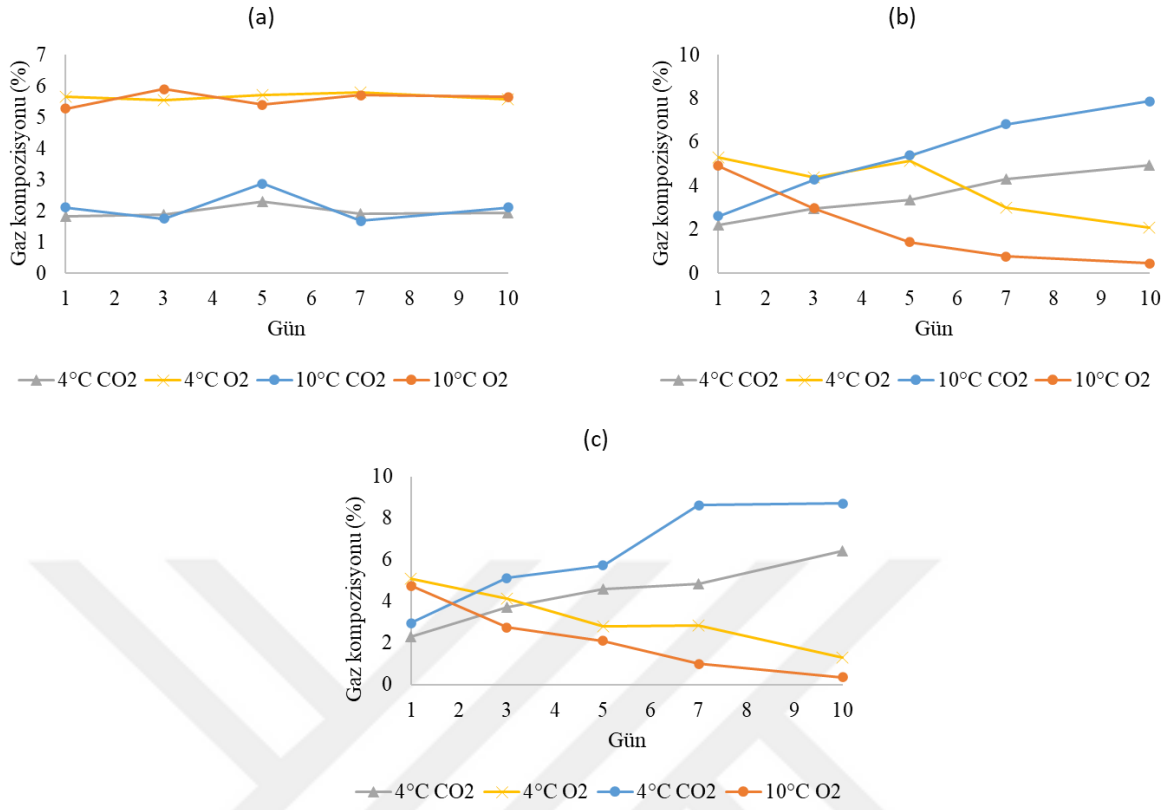
İnoküle edilen ve MAP yapılan marullarda depolamaya bağlı O₂ değişimi

	Sıcaklık (°C)	O ₂ konsantrasyonu (%)				
		1.gün	3.gün	5. gün	7. gün	10.gün
TEY-AA	4	5,67±0,18 ^{Aa}	5,55±0,17 ^{Aa}	5,70±0,13 ^{Aa}	5,80±0,00 ^{Aa}	5,57±0,11 ^{Aa}
	10	5,27±0,13 ^{Ab}	5,90±0,00 ^{Aa}	5,40±0,23 ^{Aab}	5,70±0,12 ^{Aab}	5,65±0,08 ^{Aab}
NaOCl	4	5,32±0,21 ^{Aa}	4,37±0,10 ^{Bb}	5,15±0,02 ^{Aa}	3,00±0,28 ^{Bc}	2,10±0,00 ^{Bd}
	10	4,92±0,35 ^{Aa}	2,97±0,02 ^{Cb}	1,42±0,20 ^{Cc}	0,77±0,11 ^{Ccd}	0,45±0,05 ^{Cd}
Kontrol	4	5,10±0,24 ^{Aa}	4,15±0,49 ^{Bab}	2,82±0,58 ^{Bbc}	2,85±0,26 ^{Bbc}	1,32±0,42 ^{Bc}
	10	4,75±0,18 ^{Aa}	2,75±0,08 ^{Cb}	2,10±0,28 ^{BCb}	1,00±0,29 ^{Cc}	0,35±0,02 ^{Cc}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Yıkama aşamasında 2xMİK konsantrasyondaki TEY-AA'nın 5 dakika uygulaması ile 50 ppm NaOCl'nin 15 dakika uygulaması hem mikrobiyal inhibisyon hem de marulun fiziksel, kimyasal özelliklerinin korunumu açısından en uygun konsantrasyon ve süreler olarak seçilmiştir. Bu yüzden modifiye atmosfer paketlenen marullara bu konsantrasyon ve sürelerde yıkama işlemleri gerçekleştirilmiş ve kontrol grubu olarak steril içme suyu ile 5 dk yıkanan marullar değerlendirilmiştir.

C. difficile ile inoküle edilen ve TEY-AA ile yıkanan marullarda 10 günlük depolama boyunca hem 4°C hem 10°C'de O₂-CO₂ kompozisyonunda önemli bir değişiklik olmamış ve O₂ konsantrasyonu %5'in altına inmemiştir (Tablo 24, Tablo 25). TEY-AA ile yıkama uygulamasının marullardaki solunumu minimum seviyeye indirdiği gözlenmiştir. Ancak NaOCl ile yıkanan örneklerde 10°C'de depolamada özellikle 5. günden sonra paketlerdeki O₂ seviyesi belirgin bir şekilde azalmaya başlamıştır ($P<0,05$). Bu sıcaklıkta 10. günde O₂ seviyesi %0,45 seviyesine kadar gerilemiştir. Kontrol grubunda 10°C'de 10. günün sonunda O₂ seviyesi %0,35'e kadar düşmüştür. Ancak NaOCl ile yıkamaya kıyasla bu düşüş 7. günden sonra belirgin bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 42).



Şekil 42. *C. difficile* ile inoküle edilen marullarda depolama boyunca MAP'lardaki gaz değişimi (a) TEY-AA (b) NaOCl (c) kontrol

MAP koşullarında artan süreye bağlı olarak değişen gaz kompozisyonunun *C. difficile* sporları üzerinde nasıl bir etkiye sahip olacağı açık olmamakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar (Kint vd., 2020; Morvan vd., 2021) *C. difficile*'nin zorunlu anaeroblar için beklenenden daha iyi bir şekilde O₂ toleransının olduğunu göstermiştir. O₂ ile karşılaştığında *C. difficile*, merkezi metabolizmasını O₂'ye daha az duyarlı iz yollarına yönlendirmekte ve O₂ indirgenmesinde ve oksitlenmiş hasarlı molekülerin onarımında yer alan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Morvan vd., 2021). *C. difficile* % 1-3 O₂ varlığında gelişebilmektedir. *C. difficile*'nin düşük O₂ gerilimine toleransı, genel stres tepkisinde yer alan alternatif sigma faktörünün (σ^B) varlığını gerektirmektedir. Flavodiiron (FdpA ve FdpF) ve ters rubreritirin (revRbr1 ve revRbr-2) proteinleri O₂ varlığında *C. difficile* gelişme yeteneğinde önemli rol oynamaktadır (Kint vd., 2020).

TEY-AA ile yıkama da O₂-CO₂ konsantrasyonu sabit tutulmuş olup depolama boyunca *C. difficile* sayısında bir artış gözlenmemiştir (Tablo 26). Bunun yanında hem NaOCl ile yıkamada hem de kontrol grubunda depolama boyunca O₂ konsantrasyonu kritik

seviyelere düşse de bu durum *C. difficile* sayısında artışa sebep olmamıştır (Şekil 43). Uygulanan yıkama işlemlerinin getirdiği inhibisyon etkisi dışında inoküle edilen *C. difficile* sporlarının tamamı 10 gün depolama sonunda dahi geri kazanılmıştır. Benzer şekilde Flock (2017), marullara inoküle ettikleri *C. difficile* sporlarının MAP koşullarında 4°C’de 10 günlük depolama boyunca canlılığını koruduğunu ancak toplum kaynaklı *C. difficile* enfeksiyonlarında modifiye atmosfer paketli tüketime hazır marulların rolünün halen ek araştırmalar gerektirdiğini ifade etmiştir. Ayrıca bu çalışmada da (Flock, 2017) marullara inoküle edilen *C. difficile* spor sayısı sabit kalmış olup depolama boyunca artma ya da azalma olmamıştır.

Tablo 26

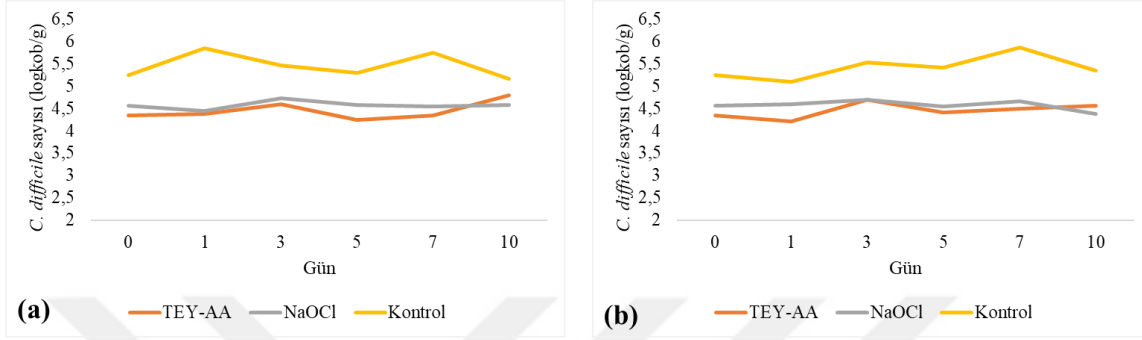
Depolama boyunca marullarda *C. difficile* sayısındaki değişim

	<i>C. difficile</i> sayısı (logkob/g)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	4,35±0,08 ^{Cab}	4,37±0,05 ^{Cab}	4,59±0,03 ^{Bab}	4,25±0,08 ^{Bb}	4,34±0,09 ^{Bab}	4,79±0,10 ^{ABCa}
10°C	4,35±0,08 ^{Cab}	4,21±0,14 ^{Cb}	4,78±0,03 ^{Ba}	4,41±0,09 ^{Bab}	4,50±0,04 ^{Bab}	4,56±0,13 ^{BCab}
NaOCl						
4°C	4,56±0,30 ^{BCa}	4,44±0,10 ^{BCa}	4,73±0,13 ^{Ba}	4,57±0,03 ^{Ba}	4,55±0,05 ^{Ba}	4,58±0,20 ^{BCa}
10°C	4,56±0,30 ^{BCa}	4,60±0,21 ^{BCa}	4,70±0,01 ^{Ba}	4,54±0,10 ^{Ba}	4,66±0,03 ^{Ba}	4,38±0,08 ^{Ca}
Kontrol						
4°C	5,24±0,16 ^{AcD}	5,84±0,04 ^{Aa}	5,46±0,01 ^{Aabcd}	5,30±0,07 ^{AcD}	5,75±0,07 ^{Aab}	5,16±0,15 ^{ABcd}
10°C	5,24±0,16 ^{AcD}	5,09±0,02 ^{Bd}	5,52±0,13 ^{Aabc}	5,41±0,02 ^{Abcd}	5,86±0,06 ^{Aa}	5,34±0,01 ^{ABcd}

*Sonaçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Farklı gıda gruplarında modifiye atmosfer paketlerde anaerob mikroorganizmaların çalışıldığı çalışmalar vardır. Yapılan çalışmaların çoğu anaerobik bir mikroorganizma olan *C. botulinum* üzerine yoğunlaşmış olsa da modifiye atmosfer paketlerde *C. botulinum* gelişmesi ve toksin oluşturmaya yönelik endişeye gerek olmadığı ifade edilmekte olup, bunun sebepleri arasında *C. botulinum*’un paket içerisinde yakın çevresindeki gaz dağılımı (ürünün yüzey ve iç kısmı) ve üründeki mevcut diğer flora ile rekabet etmek zorunda kalması belirtilmektedir (Vermeulen vd., 2013). Diğer taraftan minimum işlenmiş ürünlerin MA paketlendiği gıdalarda hücre hasarı meydana gelebilmektedir. Sporlu mikroorganizmalar

için bu durum spor yaranmasını ifade etmektedir. Spor yaranmalarının tipik semptomları arasında çimlenmenin gecikmesi, değişen besin ihtiyacı, geri kazanım için kullanılan besiyerlerine duyarlılık ve değişen optimum inkübasyon sıcaklıkları sayılabilmektedir (Vermeulen vd., 2013).



Şekil 43: Depolamaya bağlı *C. difficile* sayısındaki değişim (a) 4°C'de depolamaya bağlı *C. difficile* sayısındaki değişim (b) 10°C'de depolamaya bağlı *C. difficile* sayısındaki değişim

Yapılan bir çalışmada (Lilly vd., 1996) 1118 modifiye atmosfer paketli sebze örneğinde *C. botulinum* aranmış ve %0,36 oranında saptanmıştır. Araştırmacılar doğranmış lahana, doğranmış yeşil biber ve İtalyan salatası karışımınının *C. botulinum* tip A sporu, hindibadan oluşan salatanın ise hem *C. botulinum* tip A hem de tip B sporu içerdiğini belirtmişlerdir.

Modifiye atmosfer paketli sebzelerde yapılan başka bir çalışmada (Austin vd., 1998), botulinum toksini soğan, balkabağı, turp, salata ve tavada kızartılmış sebzelerde saptanmıştır. Yazarlar aynı zamanda proteolitik olmayan *C. botulinum*'un, 5°C'ye kadar düşük sıcaklıklarda nörotoksin üretebilirken, proteolitik suşların 15°C ve daha yüksek sıcaklıklarda nörotoksin ürettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca çoğu örneğin botulinum toksini saptanmadan önce gözle görülür şekilde bozulmuş olduğunu ancak balkabağı ve soğan örneklerinin toksin saptandıktan sonra da duyuşal olarak kabul edilebilir olmaya devam ettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *C. difficile* inoküle edilen marullarda inokülasyondan önce ön dezenfeksiyon işlemi uygulandığı için mevcut rekabetçi aerob ve anaerob flora inhibe edilmiştir. Aynı zamanda uygulanan işlemler sonucu sporların geri kazanımında sporların

çimlenmesini baskılayacak herhangi bir antibiyotik besiyerine katkı olarak ilave edilmemiştir. Bu koşullar altında 10 günlük depolama boyunca %1'in altına düşen O₂ konsantrasyonuna rağmen *C. difficile* gelişimi gözlenmemiş olup, depolama süresinin uzadığı durumda koşulların çimlenme ve toksin oluşumunu teşvik edip etmeyeceği açık değildir ve halen risk oluşturma ihtimali bulunmaktadır.

4.5.2. Depolama Boyunca Marullardaki TMAB ve Enterobacterales Yükünün Değişimi

C. difficile inoküle edilmeyen ve yıkama solüsyonları ile yıkanan marullarda toplam mezofilik aerobik bakteri ve Enterobacterales yükünün depolamaya bağlı değişimi araştırılmıştır. Ayrıca *C. difficile* inoküle edilmeyen fakat yıkama solüsyonları ile yıkanan marulların paketlerinde de O₂-CO₂ değişimi incelenmiştir. İnoküle edilmeyen marulların paketlerindeki O₂-CO₂ konsantrasyonları Tablo 27 ve Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 27

İnokülasyon yapılmayan ve MAP uygulanan marullarda depolamaya bağlı CO₂ değişimi

	Sıcaklık (°C)	CO ₂ konsantrasyonu (%)				
		1.gün	3.gün	5. gün	7. gün	10.gün
TEY-AA	4	1,86±0,04 ^{Cd}	2,25±0,05 ^{Cd}	2,70±0,05 ^{Cbcd}	2,25±0,11 ^{Cd}	2,48±0,12 ^{Dcd}
	10	2,30±0,03 ^{ABcd}	3,71±0,37 ^{Aa}	3,48±0,26 ^{ABab}	3,23±0,30 ^{Babc}	3,80±0,27 ^{Ca}
NaOCl	4	1,93±0,04 ^{Cg}	2,61±0,04 ^{BCef}	2,91±0,06 ^{BCdef}	3,30±0,11 ^{Bcd}	3,86±0,07 ^{Cc}
	10	2,25±0,03 ^{Bfg}	3,25±0,06 ^{ABcde}	3,57±0,18 ^{ABcd}	4,76±0,26 ^{Ab}	6,40±0,29 ^{Aa}
Kontrol	4	2,16±0,02 ^{Bg}	2,80±0,05 ^{BCef}	3,13±0,11 ^{BCde}	2,70±0,04 ^{BCef}	3,43±0,09 ^{Ccd}
	10	2,45±0,03 ^{Afg}	3,18±0,11 ^{ABde}	3,95±0,04 ^{Abc}	4,41±0,15 ^{Ab}	5,33±0,22 ^{Ba}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

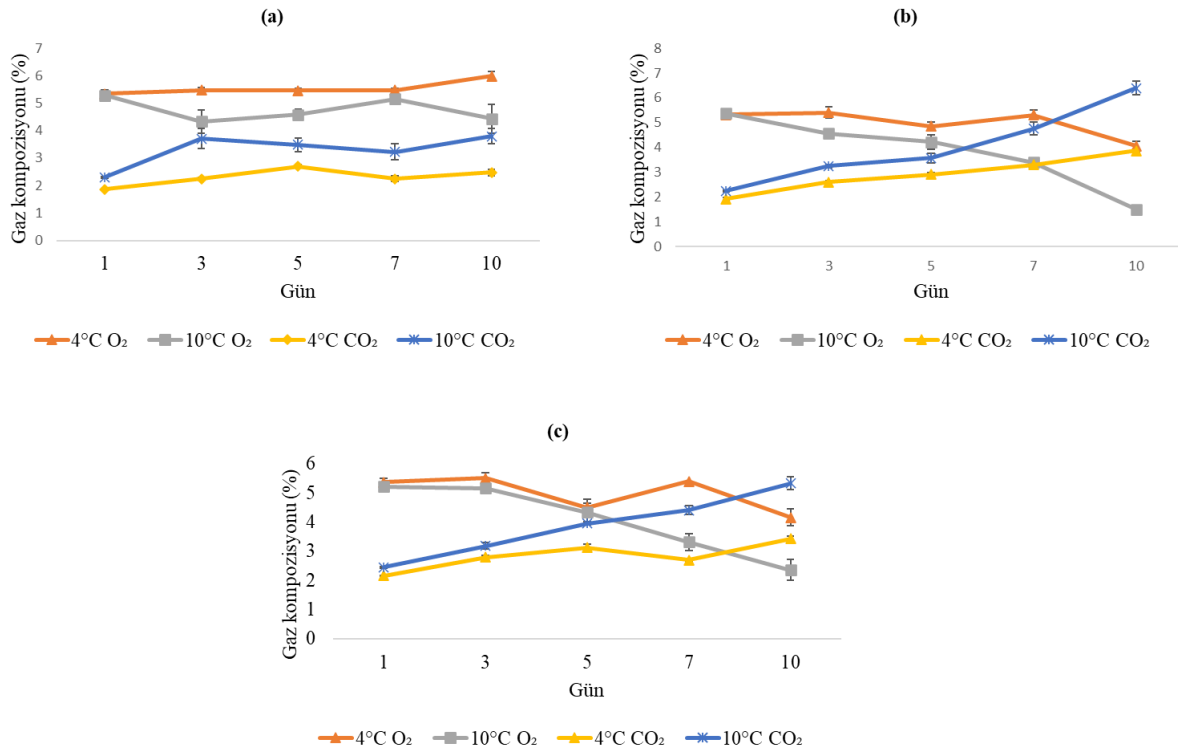
Tablo 28

İnokülasyon yapılmayan ve MAP uygulanan marullarda depolamaya bağlı O₂ değişimi

	Sıcaklık (°C)	O ₂ konsantrasyonu (%)				
		1.gün	3.gün	5. gün	7. gün	10.gün
TEY-AA	4	5,41±0,11 ^{Aabc}	5,48±0,10 ^{Aab}	5,46±0,09 ^{Aabc}	5,48±0,07 ^{Aab}	5,98±0,17 ^{Aa}
	10	5,28±0,08 ^{Aabc}	4,33±0,43 ^{Bc}	4,58±0,20 ^{ABbc}	5,15±0,13 ^{Aabc}	4,43±0,52 ^{Bbc}
NaOCl	4	5,34±0,16 ^{Aa}	5,41±0,22 ^{Aa}	4,85±0,16 ^{ABabc}	5,31±0,19 ^{Aab}	4,06±0,20 ^{Bde}
	10	5,38±0,11 ^{Aa}	4,56±0,09 ^{ABbcd}	4,22±0,30 ^{Bcde}	3,40±0,11 ^{Be}	1,50±0,17 ^{Cf}
Kontrol	4	5,36±0,14 ^{Aab}	5,51±0,19 ^{Aa}	4,50±0,29 ^{ABabc}	5,40±0,00 ^{Aab}	4,16±0,28 ^{Bcd}
	10	5,21±0,09 ^{Aabc}	5,16±0,13 ^{ABabc}	4,33±0,32 ^{Bbcd}	3,31±0,28 ^{Bde}	2,35±0,36 ^{Ce}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

TEY-AA uygulaması O₂-CO₂ konsantrasyonunu sabit seviyelerde tutarken, NaOCl ve kontrol grubunda 10°C'de depolamada O₂ konsantrasyonunda önemli bir azalma saptanmıştır (Şekil 44).



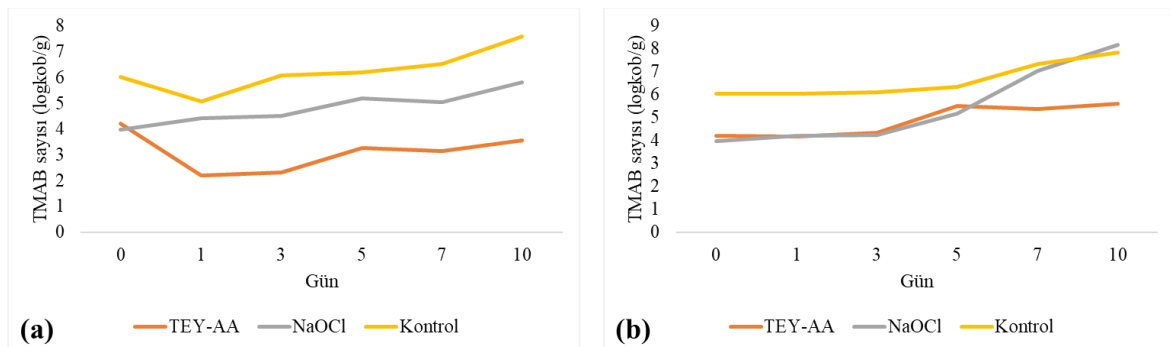
Şekil 44. *C. difficile* ile inoküle edilmeyen marullarda depolama boyunca MAP'lardaki gaz değişimi (a) TEY-AA (b) NaOCl (c) Kontrol

Depolamaya ile birlikte değişen gaz kompozisyonuna bağlı olarak, her iki sıcaklıkta da tüm yıkama uygulamalarında 10 günün sonunda hem toplam mezofilik aerobik bakteri sayısında hem de Enterobacterales sayısında artış gözlenmiştir. Toplam canlı sayısındaki en yüksek artış 3,96 log ile 10°C'de depolanan NaOCl ile yıkanan örneklerde gözlenmiştir (Tablo 29). TEY-AA ile yıkama bu artışı 4°C'de 1,36 log, 10°C'de 1,43 log seviyesinde gerçekleştirmiştir (Şekil 45).

Tablo 29
Depolama boyunca marullarda TMAB sayısındaki değişim

	TMAB sayısı (logkob/g)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	*4,21±0,2 ^{Bb}	2,20±0,02 ^{De}	2,33±0,22 ^{Cde}	3,26±0,22 ^{Dc}	3,14±0,01 ^{Ccd}	3,56±0,02 ^{Dbc}
10°C	4,21±0,2 ^{Bb}	4,19±0,08 ^{Cb}	4,33±0,22 ^{Bb}	5,51±0,24 ^{BCa}	5,37±0,10 ^{Ba}	5,62±0,01 ^{Ca}
NaOCl						
4°C	3,98±0,4 ^{Af}	4,43±0,15 ^{Cde}	4,50±0,44 ^{Bde}	5,19±0,05 ^{Ccd}	5,05±0,01 ^{Bede}	5,81±0,07 ^{Cc}
10°C	3,98±0,4 ^{Af}	4,21±0,10 ^{Ce}	4,24±0,13 ^{Be}	5,19±0,01 ^{Ccd}	7,04±0,03 ^{Ab}	8,17±0,05 ^{Aa}
Kontrol						
4°C	6,04±0,9 ^{Cab}	5,08±0,04 ^{Bc}	5,09±0,00 ^{ABc}	6,21±0,02 ^{ABb}	6,53±0,14 ^{Ab}	7,61±0,07 ^{Ba}
10°C	6,04±0,9 ^{Cab}	6,05±0,02 ^{Ab}	6,11±0,02 ^{Ab}	6,36±0,08 ^{Ab}	7,36±0,33 ^{Aa}	7,85±0,06 ^{Ba}

*Sonaçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.



Şekil 45. Depolama boyunca marullarda TMAB sayısındaki değişim (a) 4°C'de depolamada toplam canlı sayısındaki değişim (b) 10°C'de depolamada toplam canlı sayısındaki değişim

Depolama boyunca paketlerdeki Enterobacterales sayısındaki değişim değerlendirildiğinde (Tablo 30), TEY-AA ile yıkama 4°C’de depolanan örneklerde daha fazla inhibisyon sağlarken her iki sıcaklıkta da depolama boyunca Enterobacterales sayısında farklılık görülmemiştir ($P>0,05$). NaOCl ile yıkanan örneklerde ise, depolama boyunca 10°C’de daha fazla olmak üzere her iki sıcaklıkta da Enterobacterales sayısı artmıştır. En yüksek artış toplam canlı sayısında da olduğu gibi 10°C’de depolanan NaOCl ile yıkanan örneklerde olmuştur. Tüm uygulamalar içinde 4°C’deki toplam canlı ve Enterobacterales sayısındaki inhibisyon 10°C’deki inhibisyondan fazla olmuştur (Şekil 46).

Tablo 30

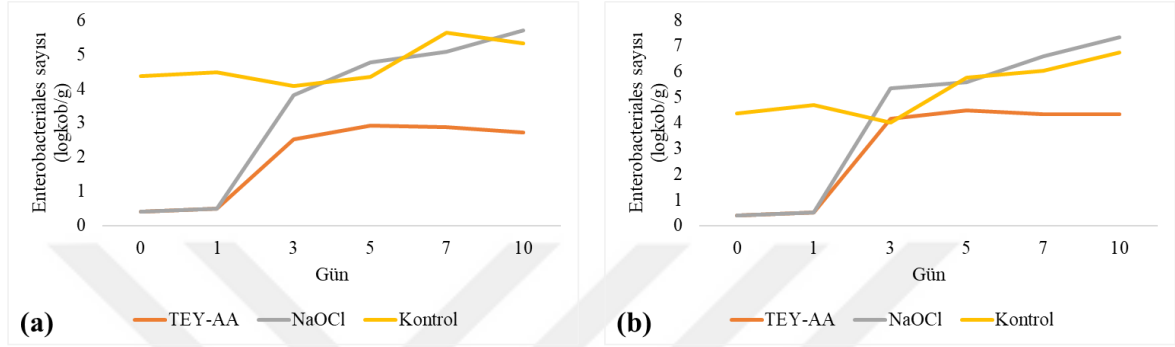
Depolama boyunca marullarda Enterobacterales sayısındaki değişim

	Enterobacterales sayısı (logkob/g)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	<1	<1	2,52±0,05 ^{Db}	2,92±0,02 ^{Cb}	2,88±0,02 ^{Eb}	2,72±0,02 ^{Eb}
10°C	<1	<1	4,16±0,06 ^{Ba}	4,48±0,12 ^{Ba}	4,35±0,14 ^{Da}	4,34±0,34 ^{Da}
NaOCl						
4°C	<1	<1	3,82±0,05 ^{Cd}	4,76±0,16 ^{Bc}	5,07±0,07 ^{Cbc}	5,71±0,06 ^{BCb}
10°C	<1	<1	5,34±0,01 ^{Abc}	5,60±0,01 ^{Ab}	6,59±0,05 ^{Aa}	7,34±0,34 ^{Aa}
Kontrol						
4°C	4,37±0,07 ^{Ade}	4,47±0,06 ^{Ade}	4,08±0,08 ^{BCe}	4,34±0,04 ^{Bde}	5,64±0,15 ^{Bbc}	5,32±0,05 ^{CDc}
10°C	4,37±0,07 ^{Ade}	4,71±0,07 ^{Ad}	4,02±0,02 ^{BCe}	5,76±0,16 ^{Abc}	6,04±0,01 ^{Bb}	6,73±0,06 ^{ABa}

*Soniclar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Yapılan bir çalışmada (Horev vd., 2012) 200 ppm klor ile yıkanan ve *S. Typhimurium* ile inoküle edilen marullar %10 O₂, %10 CO₂ ve %80 N₂ gaz kompozisyonunda MA paketlenmiştir. Araştırmacılar 20°C’de 3 gün ve 8°C’de 7 gün depolama sonunda aktif ambalajlamanın *S. Typhimurium*’un hayatta kalmasını desteklediğini belirtmişlerdir. Sharma vd., (2011) *E. coli* O157:H7 inoküle edilen ve MA paketlenen marullarda 4°C’de 10 gün depolama sonunda *E. coli* O157:H7’de azalma gözlemlediklerini, 15°C’de depolamada ise en az 2,76 log kob/g artış saptadıklarını bildirmişlerdir.

Modifiye atmosfer paketlerin gaz kompozisyonundaki gazlardan biri olan CO₂ bakteriyostatik etkiye sahiptir ve CO₂'nin inhibitör etkisi sıcaklıktaki düşüşle birlikte artmaktadır (Mahajan ve Goswami, 2001). Uygulanan antimikrobiyal yıkamaların TMAB Enterobacteriales yüklerinde düşük sıcaklıkta daha etkin olmasının CO₂'nin düşük sıcaklıklarda inhibitör etkisinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 46. Depolama boyunca marullarda Enterobacteriales sayısındaki değişim (a) 4°C'de depolama boyunca Enterobacteriales sayısındaki değişim (b) 10°C'de depolama boyunca Enterobacteriales sayısındaki değişim

4.5.3. Depolama boyunca Marullardaki pH ve SÇKM Değişimi

Depolama sırasında taze meyve sebzelerdeki organik asit değişikliğini ifade eden pH, genel olarak depolama boyunca artmakta olup, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri de yüksek pH değerleri ve dolayısıyla daha az asidik ortamda artmaktadır (Tiryaki, 2021).

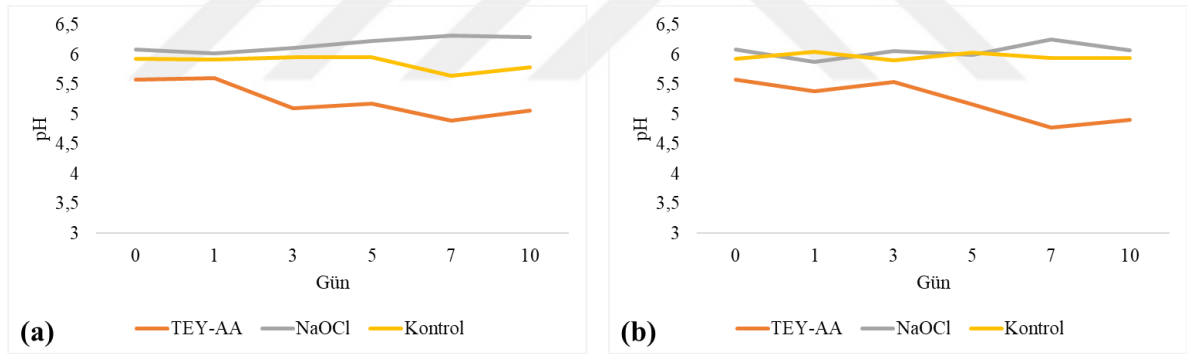
Depolama boyunca tüm yıkama uygulamalarında her iki sıcaklıkta da pH değerlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır (Tablo 31). En yüksek pH NaOCl ile yıkanan marullarda ölçülmüştür. Depolama boyunca da mikrobiyal yükte en yüksek artış NaOCl ile yıkanan marullarda gözlenmiştir. TEY-AA yıkama solüsyonunun pH'sı diğer uygulamalara kıyasla asidik olduğundan en düşük pH TEY-AA'da ölçülmüş olup, bununla ilişkili bir şekilde depolama boyunca mikrobiyal yükü en fazla kontrol altında tutan yıkama solüsyonu da TEY-AA olmuştur (Şekil 47).

Tablo 31

Depolama boyunca marullardaki pH değışimi

	pH					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	*5,58±0,04 ^{Ba}	5,61±0,04 ^{Ba}	5,10±0,00 ^{Fcd}	5,18±0,00 ^{Dc}	4,89±0,00 ^{Ee}	5,06±0,00 ^{Ed}
10°C	5,58±0,04 ^{Ba}	5,39±0,03 ^{Cb}	5,54±0,00 ^{Ea}	5,16±0,00 ^{Dc}	4,78±0,00 ^{Ff}	4,90±0,00 ^{Fe}
NaOCl						
4°C	6,09±0,01 ^{Ac}	6,02±0,02 ^{Ade}	6,11±0,00 ^{Ac}	6,23±0,01 ^{Ab}	6,32±0,02 ^{Aa}	6,29±0,00 ^{Aab}
10°C	6,09±0,01 ^{Ac}	5,88±0,03 ^{Af}	6,06±0,00 ^{Bcde}	5,99±0,00 ^{BCe}	6,25±0,00 ^{Bab}	6,08±0,00 ^{Bcd}
Kontrol						
4°C	5,93±0,00 ^{Ab}	5,92±0,05 ^{Ab}	5,96±0,00 ^{Cab}	5,96±0,01 ^{Cab}	5,65±0,00 ^{Dd}	5,79±0,00 ^{Dc}
10°C	5,93±0,00 ^{Ab}	6,05±0,01 ^{Aa}	5,90±0,00 ^{Db}	6,03±0,01 ^{Ba}	5,95±0,00 ^{Cab}	5,95±0,00 ^{Cab}

*Soniçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.



Şekil 47. Depolama boyunca marullarda pH değışimi (a) 4°C’de depolamada pH değışimi (b) 10°C’de depolamada pH değışimi

Marulda organik asitler, lipidler ve fenoller ile ilişkili ‘acılık’ ve früktoz, glikoz, sakkaroz ve lif ile doğrudan ilişkili olan ‘tatlılık’ olmak üzere tat esas olarak iki faktörden oluşmaktadır. Şeker bakımından zayıf ve fenolik bileşikler bakımından zengin olan marul, SÇKM içeriği önemli bir kalite göstergesi olarak kabul edilmemesine rağmen, zamanla tadın korunmasıyla doğrudan ilişkilidir (Vargas-Arcila vd., 2017).

Tüm yıkama uygulamalarında ve depolama sıcaklıklarında 10. günün sonunda suda çözünür kuru madde oranı başlangıça göre azalma eğiliminde olmuştur (Tablo 32, Şekil 48).

Benzer şekilde Schwambach vd., (2020) depolama boyunca SÇKM miktarında azalma gözlemlenmişler ve bu durumun solunumda ana substrat kaynağı olan başta şeker olmak üzere çözünür katıların tüketiminden kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

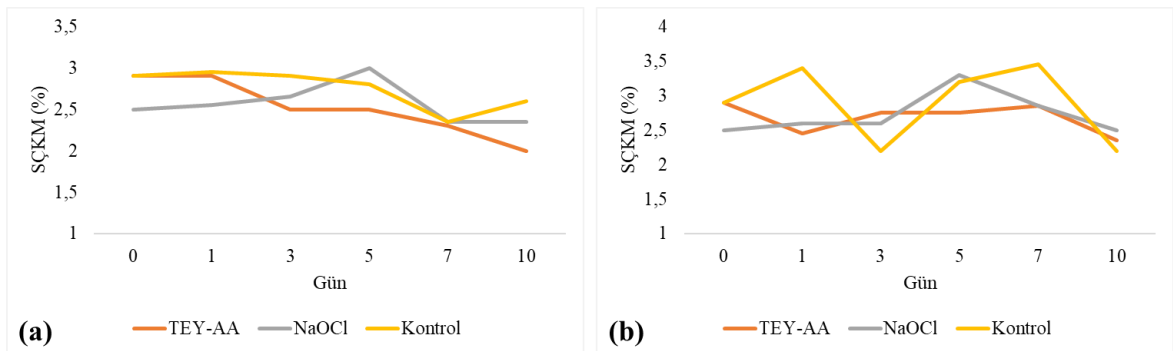
Suda çözünür kuru madde oranı arttıkça bakterilerin gelişme hızının azaldığı ifade edilmektedir (Battey ve Schaffner, 2001). Çalışmamızda depolamanın sonuna doğru azalan SÇKM oranı ile birlikte hem toplam mezofilik aerobik bakteri hem de Enterobacterales yüklerinde artış tespit edilmiştir.

Tablo 32

Depolama boyunca marullardaki SÇKM değişimi

	SÇKM (%)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	*2,90±0,10 ^{Ba}	2,90±0,00 ^{Ba}	2,50±0,00 ^{Cb}	2,50±0,00 ^{Db}	2,30±0,00 ^{Cc}	2,00±0,00 ^{Cd}
10°C	2,90±0,10 ^{Ba}	2,45±0,05 ^{Cbc}	2,75±0,05 ^{ABa}	2,75±0,05 ^{CDa}	2,85±0,05 ^{Ba}	2,35±0,05 ^{ABCbc}
NaOCl						
4°C	2,50±0,05 ^{Cc}	2,55±0,05 ^{Ccd}	2,65±0,05 ^{BCcd}	3,0±0,00 ^{BCab}	2,35±0,05 ^{Cd}	2,35±0,15 ^{ABCd}
10°C	2,50±0,05 ^{Cc}	2,60±0,00 ^{Ccd}	2,60±0,00 ^{BCcd}	3,3±0,00 ^{Aa}	2,85±0,05 ^{Bbc}	2,50±0,00 ^{ABd}
Kontrol						
4°C	2,90±0,00 ^{Bc}	2,95±0,05 ^{Bc}	2,90±0,00 ^{Ac}	2,80±0,00 ^{Ccd}	2,35±0,05 ^{Ce}	2,60±0,00 ^{Ad}
10°C	2,90±0,00 ^{Bc}	3,40±0,00 ^{Aab}	2,20±0,00 ^{De}	3,20±0,10 ^{ABb}	3,45±0,05 ^{Aa}	2,20±0,00 ^{BCe}

*Soniclar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.



Şekil 48. Depolama boyunca marullarda SÇKM değişimi (a) 4°C’de depolama boyunca suda çözünür kuru madde değişimi (b) 10°C’de depolama boyunca suda çözünür kuru madde değişimi

4.5.4. Depolama Boyunca Marullardaki Renk Değişimi

Atmosferdeki su buharı basıncının %99 ila %99,5 baęıl nemin altına dūřmesi, bitki dokusundan su kaybına neden olur. Hūcreler arasındaki boşluklardaki su, doęrudan dıř atmosfere maruz kalmaz, ancak yaralanma i dokuları açıęa çıkarır ve suyun buharlařma oranının būyūk ōlūde artırır. Bu nedenle, taze kesilmiř ūrūnūn kesim yūzeyinde kuruma oluřmasını ōnlemek, kabul edilebilir gōrsel gōrūnūmūn korunması için kritik ōneme sahiptir (Witkowska, 2013).

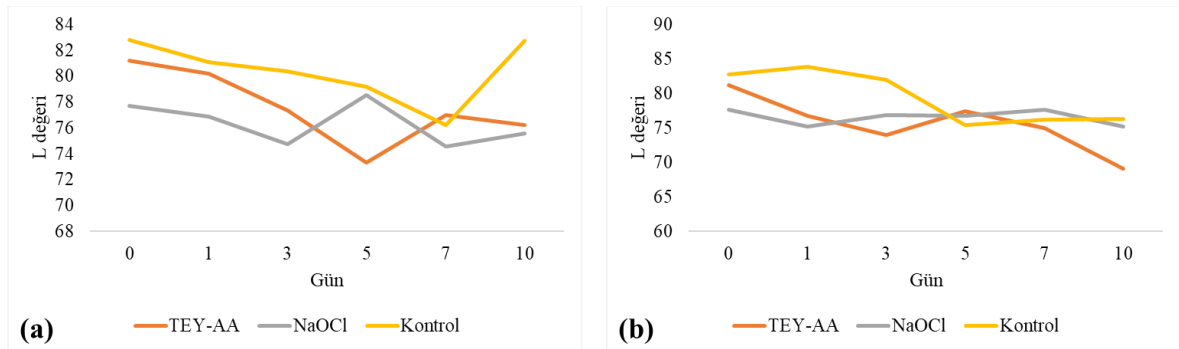
Depolama boyunca modifiye atmosfer paketlenen marullar ‘aydınlık’ olarak ifade edilen ve 0-100 arasında deęer alan ‘L’ deęeri hem 4°C’de hem 10°C’de 10 gūn depolama boyunca istatistiksel anlamda ōnemli bir deęiřiklik gōstermemiřtir (Tablo 33). Aynı zamanda marulların L deęerleri hem TEY-AA hem de NaOCl ile yıkamada kontrol grubundan farklı ōlūlmemiřtir. Ancak TEY-AA uygulamasında 10°C’de 7. gūnden sonra L deęerinde dūřūř bařlamıřtır (řekil 49).

Tablo 33

Depolama boyunca marullarda renk değişimi

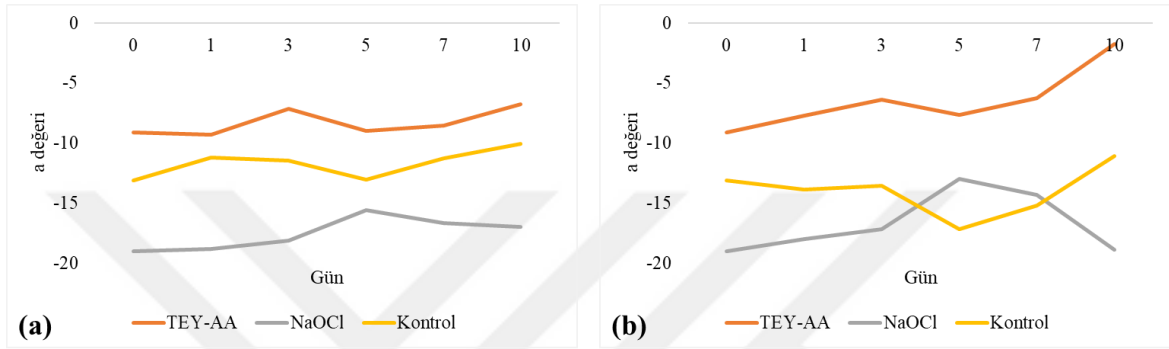
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
4°C						
TEY-AA						
L	81,24±0,15 ^{Aa}	80,19±0,12 ^{Aa*}	77,33±0,75 ^{ABa}	73,30±1,81 ^{Aab}	77,02±0,63 ^{Aa}	76,21±0,59 ^{ABab}
a	-9,10±0,17 ^{Bab}	-9,28±0,14 ^{Bb}	-7,11±0,86 ^{DEb}	-9,00±1,19 ^{Aab}	-8,50±0,18 ^{CDb}	-6,73±0,97 ^{CDb}
b	26,19±1,56 ^{Abc}	26,16±0,41 ^{Abc}	26,39±1,52 ^{Cbc}	25,92±2,93 ^{Aa}	27,82±0,17 ^{ABb}	26,26±1,58 ^{ABbc}
NaOCl						
L	77,71±1,87 ^{Aa}	76,87±3,49 ^{Aa}	74,73±2,18 ^{ABa}	78,52±1,41 ^{Aa}	74,58±0,97 ^{Aa}	75,58±2,76 ^{ABa}
a	-18,98±1,96 ^{Aa}	-18,81±2,08 ^{Aa}	-18,08±1,37 ^{Aa}	-15,56±1,34 ^{ABa}	-16,62±1,55 ^{Aa}	-16,96±1,67 ^{ABa}
b	35,27±0,37 ^{Aa}	36,58±2,98 ^{Aa}	34,81±1,99 ^{Aa}	32,00±1,53 ^{ABa}	34,50±1,88 ^{Aa}	34,28±1,94 ^{Aa}
Kontrol						
L	82,81±1,11 ^{Aa}	81,12±0,58 ^{Aa}	80,41±0,45 ^{ABa}	79,18±1,85 ^{Aa}	76,26±1,25 ^{Aa}	82,73±1,37 ^{Aa}
a	-13,09±1,30 ^{ABab}	-11,21±0,07 ^{ABab}	-11,42±1,39 ^{CDab}	-13,00±1,08 ^{Bab}	-11,27±0,67 ^{BCab}	-10,05±2,12 ^{BCb}
b	37,09±1,36 ^{Aa}	36,96±0,54 ^{Aa}	34,33±2,01 ^{ABCa}	32,65±3,24 ^{ABa}	24,24±1,41 ^{Ba}	26,02±5,67 ^{ABa}
10°C						
TEY-AA						
L	81,24±0,15 ^{Aa}	76,72±2,16 ^{Ab}	73,94±2,37 ^{Bab}	77,49±1,88 ^{Aa}	74,97±1,16 ^{Ab}	69,14±2,26 ^{Bb}
a	-9,10±0,17 ^{Bab}	-7,73±0,08 ^{Bb}	-6,35±0,35 ^{Eb}	-7,62±0,97 ^{Cb}	-6,25±0,21 ^{Db}	-1,74±0,39 ^{Dc}
b	26,19±1,56 ^{Abc}	27,15±0,97 ^{Abc}	27,95±1,25 ^{BCb}	30,49±2,46 ^{Bb}	22,96±2,80 ^{Bbc}	18,66±0,68 ^{Bc}
NaOCl						
L	77,71±1,87 ^{Aa}	75,22±2,23 ^{Aa}	76,91±1,62 ^{ABa}	76,77±2,87 ^{Aa}	77,63±1,13 ^{Aa}	75,16±2,30 ^{ABa}
a	-18,98±1,96 ^{Aa}	-17,96±1,54 ^{Aa}	-17,15±0,54 ^{ABa}	-12,96±1,22 ^{Ba}	-14,27±1,18 ^{ABa}	-18,84±1,75 ^{Aa}
b	35,27±0,37 ^{Aa}	34,41±2,49 ^{Aa}	33,96±1,02 ^{ABa}	28,45±1,22 ^{Ba}	30,30±1,81 ^{ABa}	37,42±2,44 ^{Aa}
Kontrol						
L	82,81±1,11 ^{Aa}	83,92±0,71 ^{Aa}	82,05±1,52 ^{Aa}	75,44±1,87 ^{Aa}	76,20±1,68 ^{Aa}	76,36±2,01 ^{ABa}
a	-13,09±1,30 ^{ABab}	-13,83±0,33 ^{ABab}	-13,53±0,45 ^{BCab}	-17,16±0,97 ^{ABa}	-15,21±0,37 ^{Ab}	11,07±2,57 ^{ABCab}
b	37,09±1,36 ^{Aa}	35,80±0,40 ^{Aa}	31,10±1,27 ^{ABCa}	35,32±1,16 ^{ABa}	32,75±0,63 ^{Aa}	25,04±3,82 ^{ABa}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Her değer (L, a, b) kendi içinde harflendirilmiştir.



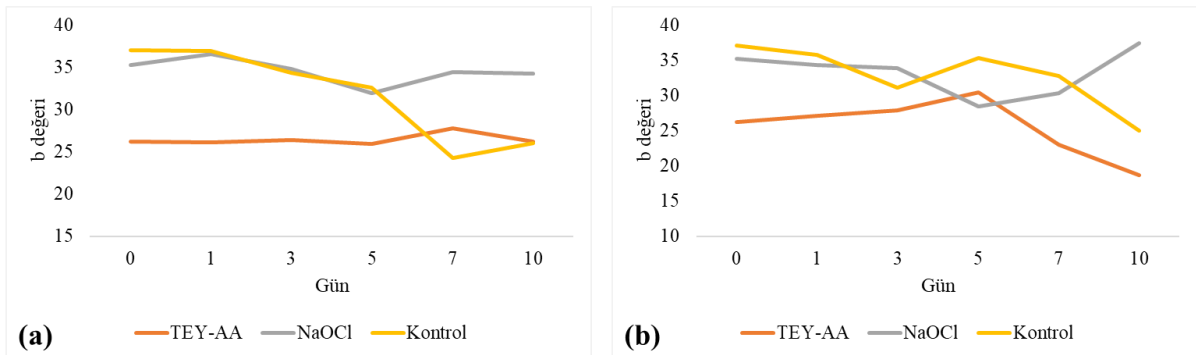
Şekil 49: Depolama boyunca marulların L değerindeki değişim (a) 4°C'de depolama boyunca L değerindeki değişim (b) 10°C'de depolama boyunca L değerindeki değişim

Kırmızı-yeşil renk eksenini ifade eden 'a' değeri ise, 4°C'de depolamada değişiklik göstermemiştir. Ancak her iki sıcaklıkta da depolamanın 1. gününden itibaren NaOCl ile yıkama marulunun yeşil rengini TEY-AA solüsyonuna göre daha fazla korumuştur. Her iki yıkama uygulamasında da zamanla yeşil renkten uzaklaşılsa da zamana bağlı olan renk kaybında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. 10°C' depolamada ise 10. günde TEY-AA ile yıkanan marullarda yeşil renk kaybı önemli olmuştur (Şekil 50).



Şekil 50: Depolama boyunca marulların a değerindeki değişim (a) 4°C'de depolamada 'a' değerindeki değişim (b) 10°C'de depolamada 'a' değerindeki değişim

Sarı-mavi renk eksenini ifade eden 'b' değerinde depolamaya bağlı önemli bir değişiklik ölçülmezken, hem 4°C'de hem 10°C'de TEY-AA ile yıkanan marullarda sarı renk baskın olmuştur. Kontrol grubunda ise 10°C'de depolamada 7. günden sonra örneklerde sararma başlamıştır (Şekil 51).



Şekil 51: Depolama boyunca marulların b değerindeki değişim (a) 4°C'de depolamada 'b' değerindeki değişim (b) 10°C'de depolamada 'b' değerindeki değişim

Yapılan bir çalışmada çay ağacı ve karanfil esansiyel yağının püskürtüldüğü marullarda 7-8°C'de 5 gün depolamada görsel bir değişiklik saptanmamıştır (Goñi vd., 2013). Diğer taraftan okaliptüs, çay ağacı, limon, biberiye ve karanfil esansiyel yağlarının pazı yapraklarına püskürtüldüğü bir çalışmada (Ponce vd., 2004) mikrobiyal yükün önemli derecede azaldığı fakat pazıların görsel özelliği bakımından yağların raf ömrünü uzatmada etkili olmadığı belirtilmiştir.

İbrahim vd., (2019), 30g/L konsantrasyonda sitrik ve askorbik asit ve 15 g/L konsantrasyonda 1-metilsiklopropan ile 5'er dakika yıkanan marulları polipropilen poşetlerde 20 gün depolamışlar ve tüm uygulamaların L, a, b değerlerini kontrol grubuna kıyasla koruduğunu ifade etmişlerdir.

4.5.5. Depolama Boyunca Marulların Tekstüründeki Değişim

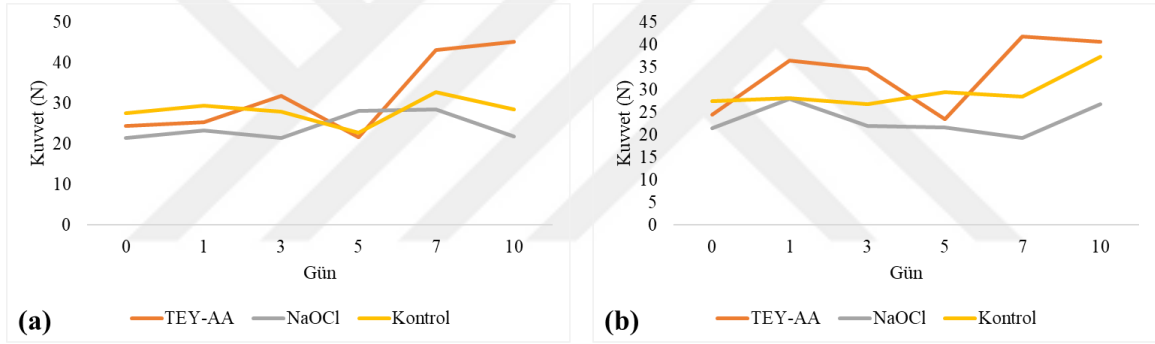
Yıkama işlemi uygulanan ve farklı sıcaklıklarda depolanan marul örneklerinin tekstüründeki değişim Tablo 34'de verilmiştir.

Tabloda gösterildiği gibi modifiye atmosfer paketlenen tüm örneklerde tekstürün sıcaklığa bağlı olarak NaOCl ve kontrol grubunda yer alan marul örneklerinin kesilmesi için gereken kuvvet genel olarak yakın değerlerde tespit edilmiştir (Tablo 34). TEY-AA ile yıkanan marullarda ise, her iki sıcaklıkta da özellikle 5. günden sonra üründe yumuşama başlamış ve tekstürde belirgin bir kayıp gözlenmiştir ($P<0,05$) (Şekil 52). Benzer şekilde Martin-Diana vd., (2005) marulları farklı konsantrasyonlardaki kalsiyum laktat çözeltilerine 1 dk daldırmışlardır. 10 günlük depolama boyunca marullara uygulanması gereken kuvvetin arttığını ve bunun marullardaki artan elastikiyet ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca bu elastikiyet artışının ve marul dokusundaki dehidrasyonun marul hücresindeki turgorun azalması (nem kaybı) ile açıklanabileceğini ifade etmişlerdir. Aynı şekilde Yossa vd., (2013) 800 ppm sinnamaldehit ile yıkadıkları marullarda 14 gün depolama sonunda marulların kesilmesi için uygulanması gereken kuvvetin arttığını ifade etmişlerdir.

Tablo 34
Depolama boyunca marullarda tekstürdeki değişim

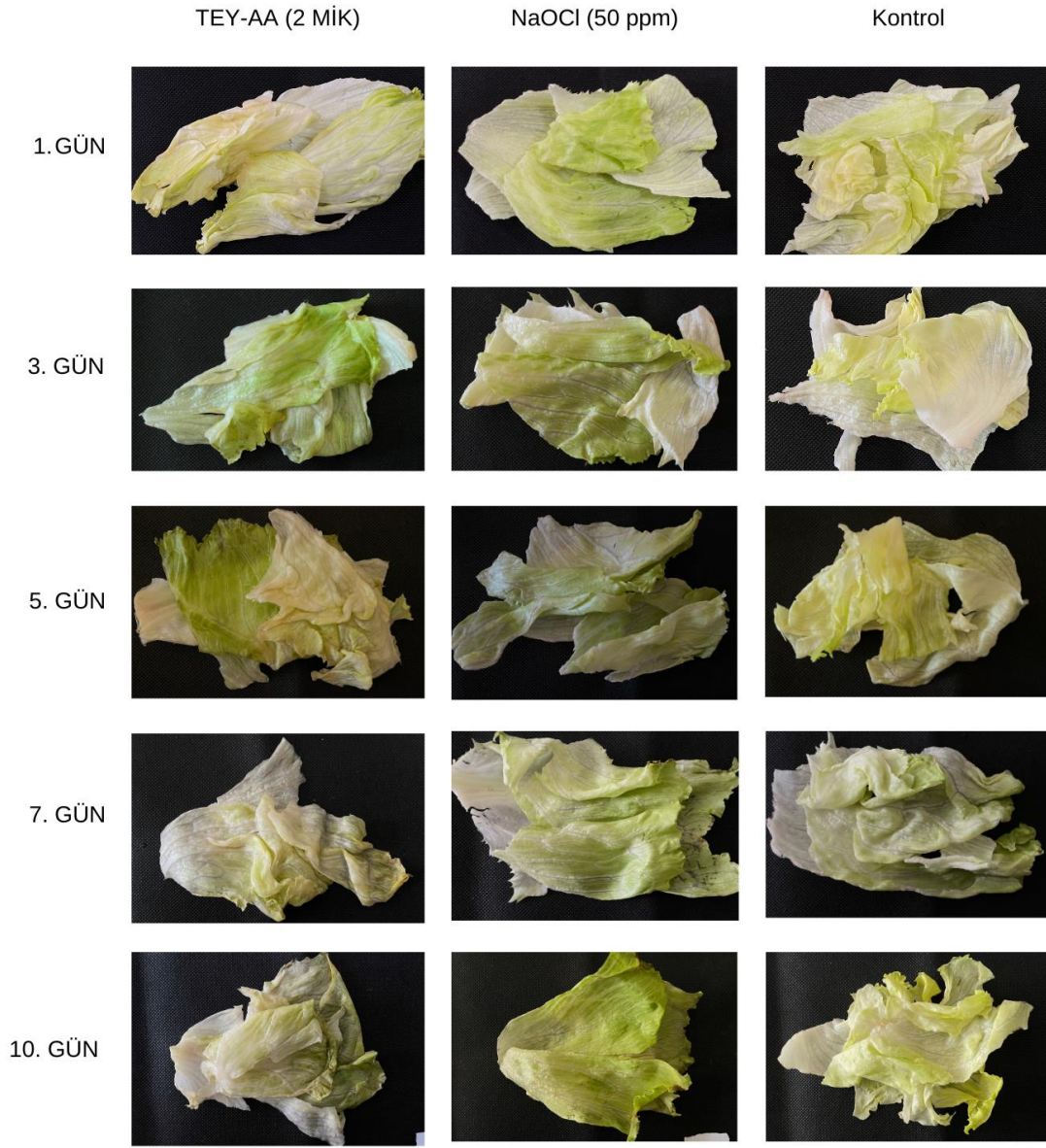
	Tekstür (N)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	24,50±1,09 ^{Bcd}	25,40±1,86 ^{Bcd}	31,80±1,09 ^{ABbcd}	21,77±1,86 ^{Ad}	43,16±2,71 ^{Aab}	45,23±6,26 ^{Aa}
10°C	24,50±1,09 ^{Bcd}	36,50±3,10 ^{Aabc}	34,67±1,55 ^{Aabcd}	23,58±0,69 ^{Ac}	41,80±3,26 ^{ABab}	40,74±3,30 ^{ABab}
NaOCl						
4°C	21,46±1,32 ^{Aa}	23,42±0,51 ^{Aa}	21,53±1,43 ^{Ca}	28,09±3,49 ^{Aa}	28,54±2,52 ^{BCa}	21,93±0,76 ^{Ca}
10°C	21,46±1,32 ^{Aa}	27,97±1,62 ^{ABa}	21,96±1,76 ^{Ca}	21,63±3,58 ^{Aa}	19,29±1,88 ^{Ca}	26,78±1,82 ^{BCa}
Kontrol						
4°C	27,56±1,67 ^{ABbc}	29,48±1,08 ^{ABabc}	27,90±1,80 ^{ABCbc}	22,77±1,08 ^{Ac}	32,82±2,97 ^{ABCab}	28,62±1,58 ^{ABCabc}
10°C	27,56±1,67 ^{ABbc}	28,16±1,11 ^{ABabc}	26,88±1,64 ^{BCbc}	29,52±1,07 ^{Aabc}	28,50±0,20 ^{BCabc}	37,31±1,66 ^{ABCa}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

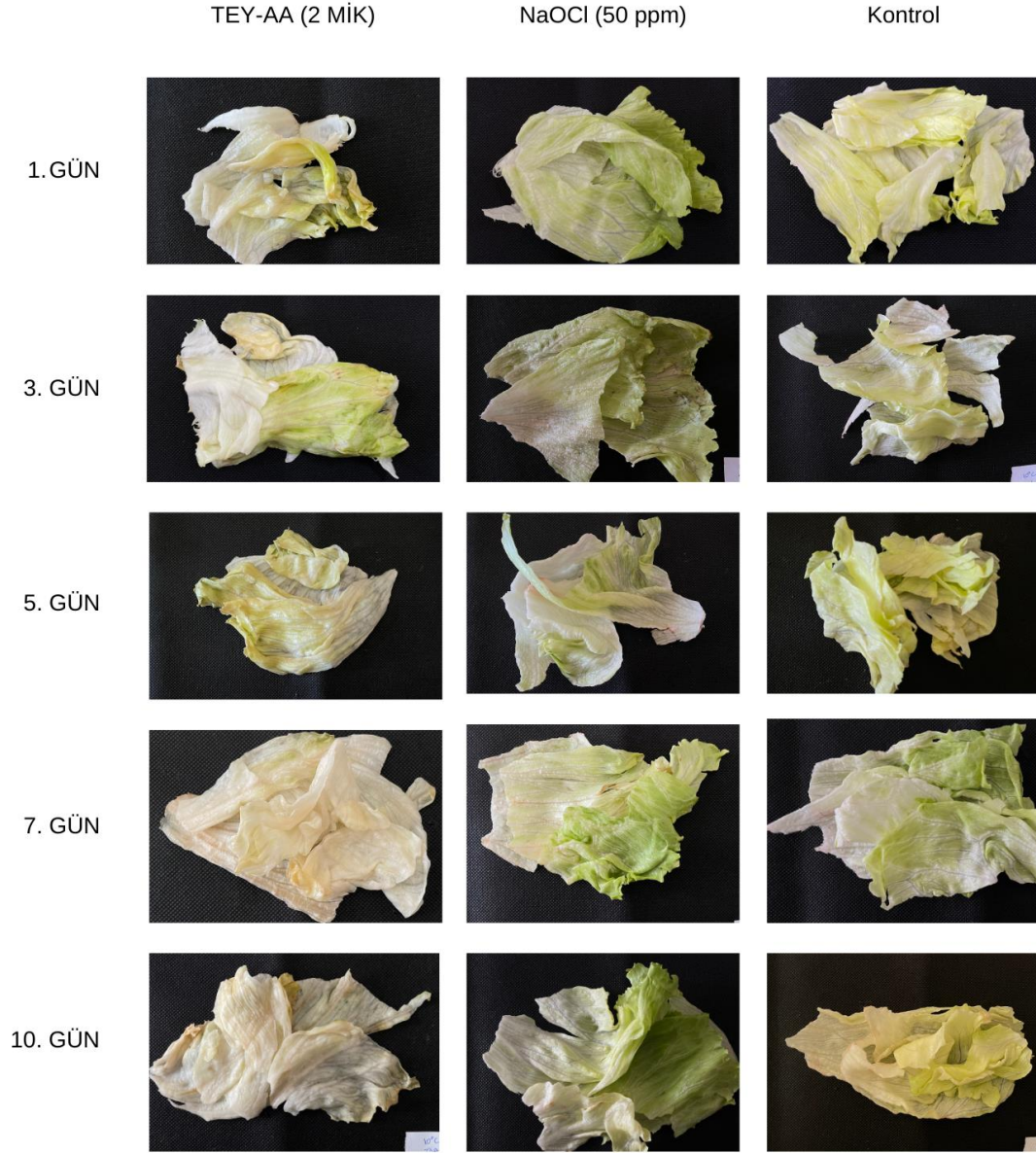


Şekil 52. Depolama boyunca marulların tekstüründeki değişimi (a) 4°C'de depolamada tekstürdeki değişim (b) 10°C'de depolamada tekstürdeki değişim

4°C ve 10°C'de depolama boyunca marullardaki fiziksel değişim sırasıyla Şekil 53 ve Şekil 54'de gösterilmiştir.



Şekil 53. 4°C’de depolama boyunca marullardaki fiziksel değişim



Şekil 54: 10°C’de depolama boyunca marullardaki fiziksel değişim

4.5.6. Depolama Boyunca Marullarda Su Kaybının Değişimi

Hasattan sonra terleme ve solunum devam etmektedir. Üründeki su tamamen kendi besin rezervine ve nem içeriğine bağlıdır. Sadece %5'lik bir ağırlık kaybı, birçok sebzenin solmuş ve buruşmuş görünmesine sebep olur. Sıcak, kuru koşullar altında doğru paketleme olmadan bu görüntü birkaç saat içinde gerçekleşebilir (Sandhya, 2010).

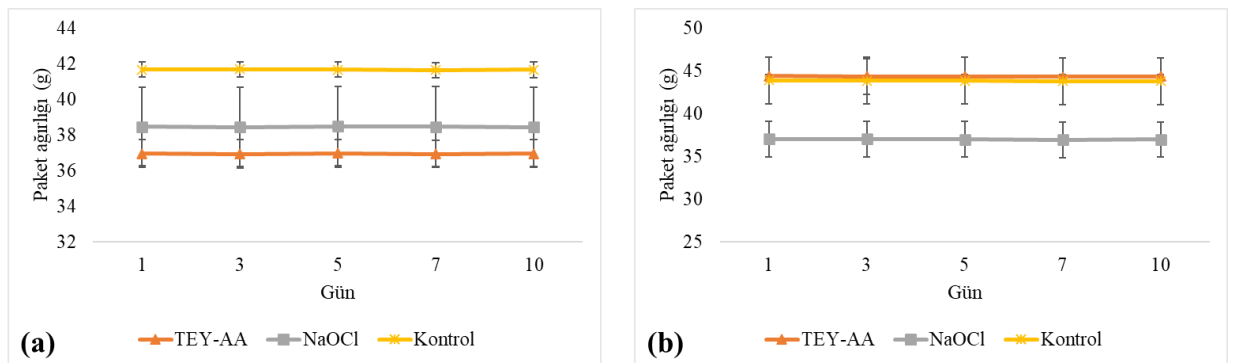
MAP işlemi su kaybını azaltan ve sebzelerin görsel kalitesinin korunmasına yardımcı olan yüksek bağıl nemi koruyabilir (Jia vd., 2009). Yapılan bir çalışmada (Manolopoulou vd., 2010) bir polietilen (PE) veya poliviniklorür (PVC) filmin taze kesilmiş marulları su kaybından korumak için en iyi özellikte olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda tüm yıkama uygulamalarında ve her iki sıcaklıkta 10 gün depolama boyunca paketlerde su kaybı olmamıştır (Tablo35, Şekil 55).

Tablo 35
Depolama boyunca modifiye atmosfer paketli marulların paket ağırlığındaki değişim

	Sıcaklık	Paket ağırlığı (g)				
		1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA	4°C	36,96±0,77	36,95±0,78	36,99±0,78	36,95±0,77	36,96±0,78
	10°C	44,40±0,21	44,36±2,08	44,38±0,20	44,34±0,20	44,37±0,23
NaOCl	4°C	38,48±2,22	38,46±2,23	38,50±2,22	38,48±2,23	38,46±2,21
	10°C	37,03±2,10	37,03±2,08	37,00±2,10	36,97±2,09	36,98±2,07
Kontrol	4°C	41,68±0,43	41,69±0,43	41,68±0,43	41,65±0,43	41,67±0,43
	10°C	43,89±2,71	43,87±2,73	43,88±2,73	43,83±2,73	43,83±2,73

*Sonaçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 55. Depolama boyunca paketlerdeki ağırlık kaybı (a) 4°C'deki ağırlık kaybı (b) 10°C'deki ağırlık kaybı

4.5.7. Depolama Boyunca Marulların Toplam Fenol İçeriklerinin Değişimi

Yıkama solüsyonu ile yıkanan marulların 4 ve 10°C’de 10 gün depolama boyunca marulların toplam fenolik içeriklerindeki değişim Tablo 36’da gösterilmiştir.

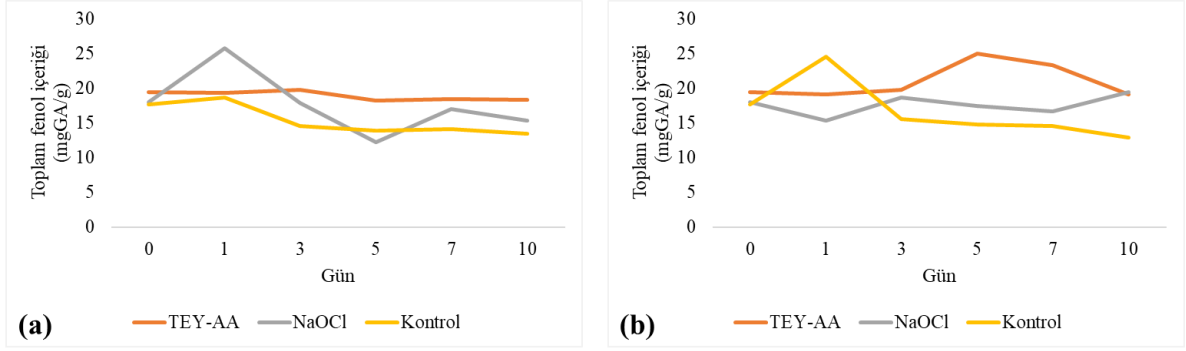
TEY-AA yıkamasında marulların toplam fenol içeriğinde depolama sıcaklıkları arasında bir fark olmamasının yanı sıra 10 günlük depolama boyunca da bir değişiklik olmamıştır. Kontrol grubunda ise 4°C’de depolanan örneklerde toplam fenol kaybı kısmi düzeydeyken 10°C’de depolanan örneklerde azalma olmuştur ancak bu farklılık istatistiki olarak önemli değildir ($P>0,05$). Bununla birlikte istatistiki olarak önemli olmasa da 10°C’de depolanan ve NaOCl ile yıkama marullarda 10 günün sonunda hafif bir artış olmuştur (Şekil 56). López-Gálvez vd., (2010) ClO₂ ve NaOCl ile yıkadıkları marullarda 10 günlük depolama sonunda toplam fenol içeriğinde değişiklik saptamamışlardır.

Tablo 36

Depolama boyunca marullardaki toplam fenol içeriği

	Toplam Fenol İçeriği (mgGA/100 g)					
	0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	10. Gün
TEY-AA						
4°C	19,44±2,03 ^{Aa}	19,35±1,05 ^{ABa}	19,79±1,05 ^{Aa}	18,21±0,94 ^{Ba}	18,43±1,00 ^{ABa}	18,30±1,00 ^{Aa}
10°C	19,44±2,03 ^{Aa}	19,17±0,97 ^{ABa}	19,79±2,73 ^{Aa}	25,04±1,68 ^{Aa}	23,36±2,52 ^{Aa}	19,13±0,40 ^{Aa}
NaOCl						
4°C	17,98±2,65 ^{Bab}	25,83±0,88 ^{Aa}	17,90±2,94 ^{Aab}	12,28±0,47 ^{Bb}	17,05±2,10 ^{ABab}	15,37±2,10 ^{Ab}
10°C	17,98±2,65 ^{Bab}	15,37±1,68 ^{Bb}	18,73±2,11 ^{Aab}	17,51±0,88 ^{Bab}	16,63±1,26 ^{ABab}	19,41±1,27 ^{Aab}
Kontrol						
4°C	17,67±1,56 ^{Bab}	18,73±1,68 ^{ABab}	14,53±0,42 ^{Ab}	13,94±0,58 ^{Bb}	14,09±1,02 ^{Bb}	13,48±0,63 ^{Ab}
10°C	17,67±1,56 ^{Bab}	24,62±3,36 ^{ABa}	15,58±1,89 ^{Aab}	14,74±1,89 ^{Bb}	14,53±0,42 ^{ABb}	12,85±2,10 ^{Ab}

*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütun üzerinde farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satır üstünde farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.



Şekil 56. Depolama boyunca marulların toplam fenol içeriği (a) 4°C'deki toplam fenol içeriği (b) 10°C'deki toplam fenol içeriği

Diğer taraftan başka bir çalışmada (Leila vd., 2021) sodyumhipoklorit, kalsiyum laktat, sistein ve askorbik asit ile yıkanan ve %3-5 CO₂, %3-5 O₂, %95-97 N₂ içeren MAP'larda 4°C'de 12 gün depolanan marullarda depolamayla birlikte toplam fenol içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

C. difficile'nin hastane patojeni olarak bilinmesinin yanında, son yıllarda enfeksiyonunun değişen epidemiyolojisiyle birlikte toplum kaynaklı enfeksiyonların görülmesi ve risk faktörlerini taşımayan bireylerde de rastlanması, etkenin hastane dışı kaynaklarının olabileceğini düşündürmektedir. Çevresel kaynaklar etkenin bulaşma faktörlerinden biri olabileceği gibi su ürünleri, et, tavuk ürünleri ve sebze gibi gıda gruplarından *C. difficile* izolasyonu mevcuttur (Taylan vd., 2020). Ayrıca bu kaynaklardan elde edilen izolatlar genotipik olarak klinik izolatlar ile benzerlik göstermektedir. Bu durum gıdaların da *C. difficile* enfeksiyonlarında bir kaynak olabileceğini düşündürmüştür. Ülkemizde gıdalarda *C. difficile* varlığını araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Sebzelerde ise böyle bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Özellikle salata yapımında kullanılan ve ısı işlem uygulanmadığı için çiğ tüketilen sebzelerde bu bakterinin varlığı daha fazla risk oluşturmaktadır.

Marulların toprağa yakın yetişmesi ve *Clostridium* türlerinin toprak kaynaklı olması bu üründe *C. difficile* kontaminasyonu riskinin olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda analize alınan marul örneklerinin hiçbirinden *C. difficile* izole edilememiştir. Ancak %4,76 oranında *C. perfringens* tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların vankomisin, klindamisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Marul örneklerinin sayısı ve temin edildikleri bölge kısıtlı olduğundan, bu çalışmada marullardan *C. difficile* izole edilememesi, yapraklı sebzelerin *C. difficile* açısından risk taşıdığı gerçeğini değiştirmemektedir. Daha geniş bir bölgeyi kapsayacak şekilde farklı yıkama, gübreleme gibi faktörlerin değerlendirildiği, daha yüksek sayıda örneğin analize alındığı çalışmalar yapılmalıdır.

C. difficile enfeksiyonlarında tedavide birinci basamak olarak kullanılan vankomisine karşı dirençli izolatlar bildirilmiştir. Bu durum antibiyotik tedavisine destek ajan ve/veya etkenin bağırsağa tutunmasına engel olacak ajan ihtiyacını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada 24 farklı bitki esansiyel yağının antibakteriyel aktivitesi hem agar kuyucuk hem disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. MİK değerleri 0,39-12,5 (% , v/v)

arasında değişmektedir. Tarçın esansiyel yağı (TEY) en yüksek antibakteriyel etkiye sahip yağ olup, ikinci sırada çay ağacı yağı gelmektedir. Bu yağların birbirleriyle ve tarçın esansiyel yağının vankomisin ile olan sinerjistik aktivitesi aditif etki olarak değerlendirilmiştir. Tarçın yağı varlığında vankomisinin MİK değeri 16 kat düşmüştür. Aynı zamanda her iki yağın da antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Özellikle tarçın esansiyel yağının *C. difficile* ile ilişkili hastalıklarda tedavide destek olabileceği düşünülmektedir. *In-vitro* ortamda araştırılan bu özelliklerin *in-vivo* ortamda da test edilmesi ve görüntüleme teknikleriyle de desteklenmesi önerilmektedir.

C. difficile enfeksiyonlarının yayılmasında ve enfeksiyonun tekrar etmesinde esas faktör spor formudur. Spor form sıcaklık, dezenfektan, UV gibi uygulamalara karşı dirençlidir. Çevresel ortamdan spor formunun uzaklaştırılmasıyla *C. difficile* enfeksiyonlarının daha kontrol edilebilir ve önlenebilir duruma geleceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada *C. difficile*'nin vejetatif formu üzerinde bakterisidal aktiviteye sahip bitki esansiyel yağları spor formu üzerinde de çalışılmıştır. Çalışılan esansiyel yağların MİK değerleri 0,78-25 (% , v/v) arasında değişmekte olup, spor formu üzerinde de en etkin yağ tarçın esansiyel yağı olmuştur. Tarçın esansiyel yağının sporisidal aktivitesi belirlenmiştir ve daha doğru bir MİK değerinin belirlenmesi amacıyla sporisidal aktivitenin matematiksel modellenmesi log-lineer, Weibull ve Modifiye Gompertz eşitliği ile yapılmış ve sonuçlar Gompertz eşitliği ile daha iyi tanımlanmıştır.

Toprak *C. difficile* kaynaklarından biri olduğundan toprak ile temas eden marullarda olası bir kontaminasyon durumunda *C. difficile* sporlarının marullardan uzaklaştırılması çalışılmıştır. Tarçın esansiyel yağı (TEY) güçlü aromaya sahip ve aynı zamanda hidrofobik olduğundan yıkama suyu amacıyla kullanıldığında daha kullanışlı ve etkin olması amacıyla asetik asit ile birleştirilmiştir. Aralarındaki ilişki sinerji (FİK:0,31) olarak belirlenmiş olup, kullanılan yağın konsantrasyonu düşürülmüştür. Böylelikle uygulanan gıdanın organoleptik özelliklerinin de minimum seviyede etkilenmesi sağlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda tarçın esansiyel yağı-asetik asit kombinasyonu (MİK, 2xMİK, 4xMİK) ve NaOCl (50, 100, 200 ppm) ile *C. difficile* inoküle edilen marullar 5 ve 15 dk daldırma yöntemi ile yıkanmıştır. Yıkamanın aynı zamanda toplam aerobik mezofilik yüke ve Enterobacterales yüküne olan etkisi de araştırılmıştır. 2xMİK konsantrasyondaki TEY-AA'nın 5 dk ve 50 ppm NaOCl'nin

15 dk uygulanması hem mikrobiyal inhibisyon hem de marulların fiziksel/kimyasal özelliklerinin korunumu açısından en uygun konsantrasyon ve süreler olmuştur.

Modifiye atmosfer paketlenme (MAP) özellikle taze kesilmiş sebze endüstrisinde ürünün raf ömrünü uzatma amacıyla sık kullanılan paketlenme çeşitlerinden biridir. Ancak depolama boyunca sebzenin solunumuyla birlikte paket içinde azalan O₂ ve artan CO₂ ile anaerobik mikroorganizmaların varlığında, gelişmeleri söz konusu olabilir. Çalışmamızda marullara MAP uygulamasında inoküle edilen *C. difficile*'nin depolamaya bağlı olarak çimlenmesi takip edilmiştir. 10 günlük depolamanın sonunda TEY-AA ile yıkanan örneklerde gaz değişimi olmasa da NaOCl ve çeşme suyu ile yıkanan örneklerde O₂ oranı %1'in altına düşmesine rağmen *C. difficile* sayısında bir artış gözlenmemiştir. Toplam aerobik mezofilik yük ve Enterobacterales sayısında ise hem 4 hem 10°C'de özellikle 5. günden sonra artış gözlenmiştir.

Sonuç olarak;

- Gıdaların *C. difficile* için bir kaynak olup olmadığının açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Özellikle anaerobik yükün fazla olduğu gıdalarda *C. difficile* aranmasında mevcut besiyerleri ve antibiyotik gibi seçici ajanlar yetersizdir. *C. difficile*'nin gıdalarda aranmasında ve elde edilen izolatların tanımlanmasında yöntemsel eksiklikler vardır.
- Tarçın esansiyel yağı *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonlarda tedaviye destek ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir.
- *C. difficile*'nin çevresel yükünün azaltılmasında tarçın esansiyel yağı içeren dezenfektanlar klor bazlı dezenfektanlara alternatif olabilir.
- Marullardaki olası bir *C. difficile* kontaminasyonu durumunda tarçın esansiyel yağı-asetik asit karışımı ev tipi dezenfektan olarak kullanılabilir ve böylelikle olası bir enfeksiyon riski düşürülebilir.
- TEY-AA ile yıkanan marullarda depolama boyunca gaz kompozisyonu sabit kalmıştır. Bu durum mikrobiyal gelişmeyi yavaşlattığı gibi ürünün raf ömrünü artırabilir. 10 günlük depolama boyunca değişen gaz kompozisyonunda dahi *C. difficile* sayısı artmamıştır. Ancak farklı sebze gruplarının solunum hızları da farklı olacağından hem diğer sebzelerde hem

de daha uzun depolama sürelerinde MAP'ın *C. difficile* çimlenmesini teşvik edip etmeyeceği araştırılmalıdır.



KAYNAKÇA

- Abd-Alla, M. A., Abd-El-Kader, M. M., Abd-El-Kareem, F. ve El-Mohamedy, R. S. R. (2011). "Evaluation of lemongrass, thyme and peracetic acid against gray mold of strawberry fruits". *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1775-1787.
- Adegboyega, T. T. (2014). "Environmental sources *Clostridium difficile* in Lagos State, Nigeria". *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 3, 1-5.
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S. ve Gupta, R. S. (2016). "Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- Ajayi, O. A., Amokeodo, M. I. ve Akinwunmi, O. O. (2017). "Microbial quality of selected ready to eat vegetables from Iwo, Nigeria and effectiveness of rinsing agents". *Applied Tropical Agriculture*, 22(2), 131-137. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35068.90249>.
- Akbas, M. Y. ve Ölmez, H. (2007). "Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2609-2616. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3016>.
- Aktorides, K., Papatheodorou, P. ve Schwan, C. (2018). "Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT)- A virulence factor disturbing the cytoskeleton". *Anaerobe*, 53, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>.
- Al Saif, N. ve Brazier, J. S. (1996). "The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales". *Journal of Medical Microbiology*, 45(2), 133-137. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133>
- Alam, M. (2014). "Microbial status of irrigation water for vegetables as affected by cultural practices". Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Faculty of

Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science Department of Biosystems and Technology, Sweden.

- Aleksić, A., Stojanović-Radić, Z., Harmanus, C., Kuijper, E. J. ve Stojanović, P. (2022). “In vitro anti-clostridial action and potential of the spice herbs essential oils to prevent biofilm formation of hypervirulent *Clostridioides difficile* strains isolated from hospitalized patients with CDI”. *Anaerobe*, 76, 102604. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102604>
- Alemu, G., Mama, M. ve Siraj, M. (2018). “Bacterial contamination of vegetables sold in Arba Minch Town, Southern Ethiopia”. *BMC Research Notes*, 11(1) 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3889-1>.
- Al-Gamal, M. S., Donia, M. A. A. ve El-Sideek, L. (2019). “Bacterial contamination of vegetables irrigated with wastewater”. *Current Science International*, 8(4), 776–788. <https://doi.org/10.36632/csi/2019.8.4.17>.
- Aljarallah, K. M. (2017). “Conventional and alternative treatment approaches for *Clostridium difficile* infection”. *International Journal of Health Science*, 11(1), 50–59.
- Alvarez, M. V., Moreira, M. D. R., Roura, S. I., Ayala-Zavala, J. F. ve González-Aguilar, G. A. (2015). “Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of fresh and processed fruits and vegetables: Types of antimicrobials”. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 287-313. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00013-X>.
- Anjuwon-Foster, B. R., Maldonado-Vazquez, N. ve Tamayo, R. (2018). “Characterization of flagellum and toxin phase variation in *Clostridioides difficile* ribotype 012 isolates”. *Journal of Bacteriology*, 200(14), e00056-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00056-18>
- Arritt, F. M., Eifert, J. D., Jahncke, M. L., Pierson, M. D. ve Williams, R. C. (2007). “Effects of modified atmosphere packaging on toxin production by *Clostridium botulinum* in raw aquacultured summer flounder fillets (*Paralichthys dentatus*)”. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1159-1164. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.5.1159>.

- Artés-Hernández, F., Martínez-Hernández, G. B., Aguayo, E., Gomez, P. A. ve Artes, F. (2017). “Fresh-cut fruit and vegetables: emerging eco-friendly techniques for sanitation and preserving safety”. In I. Kahramanoglu (Ed.), *Postharvest Handling* (pp. 7–45). London: InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69476>
- Atasoy, F. ve Gücükoğlu, A. (2017). “Detection of *Clostridium difficile* and toxin genes in samples of modified atmosphere packaged (MAP) minced and cubed beef meat”. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 64, 165-170. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002794.
- Austin, J. W., Dodds, K. L., Blanchfield, B. ve Farber, J. M. (1998). “Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on inoculated fresh-cut packaged vegetables”. *Journal of Food Protection*, 61(3), 324-328. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.3.324>
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E. ve Lyras, D. (2014). “*Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen”. *Gut Microbes*, 5(5), 579-593. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>.
- Aytar, M., Oryaşın, E., Başbülbul, G. ve Bozdoğan, B. (2019). “Agar Well Difüzyon Yönteminde Standardizasyon Çalışması”. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences*, 2(2), 138-145.
- Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Neto, N. J. G., De Oliveira, M. E. G. ve De Souza, E. L. (2011). “Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables”. *Food Research International*, 44(5), 1541-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.012>.
- Baban, S. T., Kuehne, S. A., Barketi -Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R., Kansau, I., Collignon, A. ve Minton, N. P. (2013). “The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain”. *PLoS ONE*, 8(9), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>.
- Baines, S. D. ve Wilcox, M. H. (2015). “Antimicrobial resistance and reduced susceptibility in *Clostridium difficile*: potential consequences for induction, treatment, and

- recurrence of *C. difficile* infection”. *Antibiotics*, 4(3), 267–298. <https://doi.org/10.3390/antibiyotikler4030267>.
- Bakri, M. M., Brown, D. J., Butcher, J. P. ve Sutherland, A. D. (2009). “*Clostridium difficile* in ready-to-eat salads”, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 817. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081186>.
- Balkhair, K. S. (2016). “Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater”. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.029>.
- Balouiri, M., Sadiki, M. ve Ibsouda, S. K. (2016). “Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review”. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Banach, J. L., Sampers, I., Van Haute, S. ve Van der Fels-Klerx, H. J. (2015). “Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water”. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8658-8677. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808658>.
- Banawas, S. S. (2018). “*Clostridium difficile* infections: a global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms”. *BioMed Research International*, 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/8414257>.
- Barbosa, I. M, Medeiros, J. A. C., Oliveira, K. Á. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M. ve Souza, E. L. (2016). “Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables”. *Food Control*, 59, 468-477. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.017>.
- Barbosa, J., Campos, A. ve Teixeira, P. (2020). “Methods currently applied to study the prevalence of *Clostridioides difficile* in foods”. *AIMS Agriculture and Food*, 5(1), 102-128. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.1.102>.
- Barra-Carrasco, J. ve Paredes-Sabja, D. (2014). “*Clostridium difficile* spores: a major threat to the hospital environment”. *Future Microbiology*, 9(4), 475-486. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.2>.
- Basak, S. ve Guha, P. (2017). “Use of predictive model to describe sporicidal and cell

- viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice”. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.024>.
- Battey, A. S. ve Schaffner, D. W. (2001). “Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*”. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 237-247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01381.x>
- Baur, S., Klaiber, R. G., Koblo, A., Carle, R. (2004). “Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 52(23), 7017-7025. <https://doi.org/10.1021/jf048961a>.
- Bautista, K. ve Thiagarajan, A. R. T. (2019). “Study on the microbial quality of edible green vegetables and methods to eliminate the microorganisms by using domestic antiseptic products”. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 8(2), 60-65. <https://doi.org/10.15640/jaes.v8n2a8>.
- Bencardino, D., Vitali, L. A. ve Petrelli, D. (2018). “Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing methods”. *Italian Journal of Food Safety*, 7(1), 6913. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6913>.
- Berenbaum, M. C. (1978). “A method for testing for synergy with any number of agents”. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.122>.
- Bezanson, G. S., Ells, T. C. ve Prange, R. K. (2014). “Effect of composting on microbial contamination and quality of fresh fruits and vegetables- A mini-review”. *Acta Horticulturae*, 1018, 631–638. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1018.70>.
- Bhunja, A. K. (2018). “*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*”. *Foodborne Microbial Pathogens*, Food Science Text Series, 209–228. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_12.
- Bingol, E. B., Hampikyan, H., Muratoğlu, K., Akkaya, E., Çetin, Ö. ve Çolak, H. (2020). “Characterisation and antibiotic susceptibility profile of *Clostridioides (Clostridium)*

- difficile* isolated from chicken carcasses”. *Journal of Veterinary Research* (Poland), 64(3), 407–412. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0052>.
- Błaszczuk, N., Rosiak, A. ve Kałużna-Czaplińska, J. (2021). “The potential role of cinnamon in human health”. *Forests*, 12(5), 648. <https://doi.org/10.3390/f12050648>.
- Borriello, S. P. (1998). “Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection”. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(3), 13-19. https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl_3.13.
- Brown, K. A., MacDougall, L. K., Valenta, K., Simor, A., Johnstone, J., Mubareka, S., Broukhanski, G., Garber, G., McGeer, A. ve Daneman, N. (2018). “Increased environmental sample area and recovery of *Clostridium difficile* spores from hospital surfaces by quantitative PCR and enrichment culture”. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 39(8), 917-923. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.103>.
- Buldain, D., Gortari Castillo, L., Marchetti, M. L., Julca Lozano, K., Bandoni, A., ve Mestorino, N. (2021). “Modeling the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* essential oil at different pH conditions”. *Antibiotics*, 10(2), 222, 1-14. <https://doi.org/10.3390/antibiyotikler10020222>.
- Caleb, O. J., Mahajan, P. V., Al-Julanda Al- Said, F. ve Opara, U.L. (2013). “Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences-a review”. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 303–329. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0932-4>.
- Candel-Pérez, C., Ros-Berruezo, G. ve Martínez-Graciá, C. (2019). “A review of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain”. *Food Microbiology*, 77, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.012>.
- Caner, C. ve Aday, M. S. (2009). “Maintaining Quality of Fresh Strawberries Through Various Modified Atmosphere Packaging”. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 22(2), 115-122. <https://doi.org/10.1002/pts.831>.
- Carella, L. J. (2014). Use of oregano essential oil and acetic acid to reduce *Salmonella* contamination on romaine lettuce. Master Thesis. University of Georgia, Georgia.
- Carson, C. F., Hammer, K. A. ve Riley, T. V. (2006). “*Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties”. *Clinical Microbiology*

- Reviews*, 19(1), 50-62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.
- Carvalho, P., Barbosa, J. ve Teixeira, P. (2019). “Are meats indeed sold in Portugal without *Clostridioides difficile*?”. *Acta Alimentaria*, 48(3), 391–395. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.3.15>.
- Cemeroğlu B. S., 2013. “Gıda Analizleri”, 3. Baskı, Bizim Grup Basımevi, 480.
- Che, C. T., Wang, Z. J., Chow, M. S. ve Lam, C. W. (2013). “Herb-herb combination for therapeutic enhancement and advancement: Theory, practice and future perspectives”. *Molecules*, 18(5), 5125–5141. <https://doi.org/10.3390/molecules18055125>.
- Chen, J. H. ve Hotchkiss, J. H. (1993). “Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging”. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 972-977. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77424-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77424-X).
- Claire, B., Smith, J. P., El-Khoury, W., Cayouette, B., Ngadi, M., Blanchfield, B. ve Austin, J. W. (2004). “Challenge studies with *Listeria monocytogenes* and proteolytic *Clostridium botulinum* in hard-boiled eggs packaged under modified atmospheres”. *Food Microbiology*, 21(2), 131-141. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00062-5).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. Approved Standard-eighth edition. CLSI document M11-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.
- Collery, M. M., Govind, R., Minton, N. P. ve Kuehne, S. A. (2013). “Pathogenicity mechanisms of *Clostridium difficile*”. *Future Medicine*, 20–33. <https://doi.org/10.2217/ebo.13.187>.
- Costa, C. L., Azevedo, C. P., Quesada-Gómez, C., Brito, G. A. C., Regueira-Neto, M. D. S., Guedes, G. M. M., Rocha, M. F. G., Sidrim, J. J. C., Cordeiro, R. A., Carvalho, C. B. M. ve Castelo-Branco, D. S. C. M. (2021). “Inhibitory effect of Brazilian red propolis on planktonic and biofilm forms of *Clostridioides difficile*”. *Anaerobe*, 69,102322, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102322>.
- Coswosck, K. H. C., Giorgette, M. A., Lepaus, B. M., Silva, E. M. M. D., Sena, G. G. S., Azevedo, M. C. D. A. ve São José, J. F. B. D. (2020). “Impact of alternative sanitizers

- on the physicochemical quality, chlorophyll content and bioactive compounds of fresh vegetables”. *Food Science and Technology*, 41, 328-334. <https://doi.org/10.1590/fst.02320>.
- Curry, S. R. (2010). “*Clostridium difficile*”. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 329-342. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.001>.
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A. ve Biesiada, G. (2019). “*Clostridium difficile* infection: review”. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38, 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>.
- Đapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S.A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D. ve Unnikrishnan, M. (2013). “Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*”. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545–555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>.
- Davidson, P. M., Critzer, F. J. ve Taylor, T. M. (2013). “Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods”. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 163-190. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182535>.
- Delmée, M. (2001). “Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease”. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(8), 411–416. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00294.x>.
- Denève, C., Delomenie, C., Barc, M. C., Collignon, A. ve Janoir, C. (2008). “Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression”. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 732–738. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47676-0>.
- Denève, C., Janoir, C., Poilane, I., Fantinato, C. ve Collignon, A. (2009). “New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis”. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(S1), 24–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70012-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70012-3).
- Der, J., Amany, B., Dzata, F., Wurapa, F., Afari, E., Apori, O. ve Oluabunwo, C. (2013). “Food borne outbreak at a salad eatery, Ghana”. *International Journal of Tropical Disease & Health*, 3 (4): 328-338. <https://doi.org/10.9734/IJTDH/2013/5846>.

- Dharmasena, M. ve Jiang, X. (2018). “Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from animal manure and composts being used as biological soil amendments”. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.00738-18>.
- Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R. ve Mastrantonio, P. (2012). “Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), 318-325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x>.
- Dubreuil, L., Jehl, F., Cattoen, C., Bonnet, R., Bru, J. P., Caron, F., Cattoir, V., Courvalin, P., Jarlier, V., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Marie-Cecile, P. L. I. Y., Soussy, C. J., Varon, E. ve Weber, P. (2020). “Improvement of a disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria”. French recommendations revisited for 2020. *Anaerobe*, 64, 102213. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102213>.
- Dyer, C., Hutt, L. P., Burky, R. ve Joshi, L. T. (2019). “Biocide resistance and transmission of *Clostridium difficile* spores spiked onto clinical surfaces from an American health care facility”. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(17), 1-11. <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-19>.
- Eckert, C., Burghoffer, B. ve Barbut, F. (2013). “Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France”. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1435–1438. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056358-0>.
- Embleni, A. (2013). “Modified atmosphere packaging and other active packaging systems for food, beverages and other fast-moving consumer goods”. *Trends in packaging of food, beverages and other fast-moving consumer goods (FMCG)*, 22-34. <https://doi.org/10.1533/9780857098979.22>.
- Erikstrup, L. T., Danielsen, T. K. L., Hall, V., Olsen, K. E. P., Kristensen, B., Kahlmeter, G. ve Justesen, U. S. (2012). “Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates”. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, E266–E272. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x>.

- EUCAST (2022). The European committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Version 12.0.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). “Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp in foodstuffs”. *EFSA Journal*, 199, 1-65.
- Faissal, A., Ouazzani, N., Parrado, J. R., Dary, M., Manyani, H., Morgado, B. R., Barragan, M. D. ve Mandi, L. (2017). “Impact of fertilization by natural manure on the microbial quality of soil: Molecular approach”. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1437–1443. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.005>.
- Farber, J. N., Harris, L. J., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Gorney, J. R., Garrett, E. H. ve Busta, F. F. (2003). “Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce”. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2, 142-160. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00032.x>.
- Figueiredo, G. G. O., Lopes, V. R., Romano, T. ve Camara, M. C. (2020). “*Clostridium*”. *Beneficial Microbes in Agro-ecology*, 477–491. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00022-8>.
- Finegold, S. M., Summanen, P. H., Corbett, K., Downes, J., Henning, S. M. ve Li, Z. (2014). “Pomegranate extract exhibits *in vitro* activity against *Clostridium difficile*”. *Nutrition*, 30(10), 1210–1212. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.02.029>.
- Firouz, M. S., Alimardani, R., Mobli, H. ve Mohtasebi, S. S. (2021). “Effect of modified atmosphere packaging on the mechanical properties of lettuce during shelf life in cold storage”. *Information Processing in Agriculture*, 8(4), 485-493. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2020.12.005>.
- Flock, G. (2017). *Clostridioides difficile*: A Study on its Potential as a Foodborne Pathogens and Strategies for Controlling its Transmission. Doctoral Thesis, University of Connecticut Graduate School, United States.
- Fontana, C., Jezzi, T., Testore, G. P. ve Dainelli, B. (1995). “Differentiation of *Clostridium difficile*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, and *Clostridium*

perfringens from Diarrheal Stool by API ZYM and API LRA Oxidase Test”. *Microbiology and Immunology*, 39(4), 231-235. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02194.x>.

Gajewska, D., Katarzyna Ke szycka, P. ve Szkop, M. (2019). “Dietary salicylates in herbs and spices”. *Food and Function*, 10, 7037–7041. <https://doi.org/10.1039/C9F01660K>.

Ganeshan, S. ve Neetoo, H. (2015). “A study on the contamination routes of leafy greens and onion plants by *Escherichia coli* and *Listeria innocua*”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12), 20–35. <https://doi.org/10.24297/jaa.v5i2.5082>.

García, J. S. B. (2019). Disinfection of Produce Using Stabilized Emulsions of White Mustard Essential Oil and Chlorine Wash. *Bachelor Thesis*, University of Zamorano, Honduras.

Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P. ve Van Impe, J. F. (2005). “GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves”. *International Journal of Food Microbiology*. 102(1):95-105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038.

Gerding, D. N., Muto, C. A. ve Owens Jr, R. C. (2008). “Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection.” *Clinical Infectious Diseases*, 46, 43-49. <https://doi.org/10.1086/521861>.

Ghourchian, S., Douraghi, M. Baghani, A. (2021). “Detection and frequency of enterotoxin (cpa, cpe) genes of *Clostridium perfringens* isolated from dehydrated vegetables by PCR”. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 29(133), 63-67. <https://doi.org/10.30699/jambs.29.133.63>.

Giannakourou, M. C. ve Tsironi, T. N. (2021). “Application of processing and packaging hurdles for fresh-cut fruits and vegetables preservation”. *Foods*, 10(4), 830. <https://doi.org/10.3390/foods10040830>.

Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F. ve Allende, A. (2009). “Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions”. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>.

- Goñi, M. G., Tomadoni, B., Moreira, M. R. ve Roura, S. I. (2013). “Application of tea tree and clove essential oil on late development stages of Butterhead lettuce: Impact on microbiological quality”. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.021>.
- Gorris, L. G. M. ve Peppelenbos, H. W. (2020). “Modified-Atmosphere Packaging of Produce*”. M.S., Rahman, (ed). *Handbook of Food Preservation*, 14, CRC Press Taylor and Francis Group: ABD.
- Gupta, A. ve Khanna, S. (2014). “Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat”. *Infection and Drug Resistance*. 7, 63-72. <https://doi.org/10.2147/IDR.S46780>.
- Güran, H. S. ve İlhak, O. I. (2015). “*Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the eastern region of Turkey”. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(4), 359–364. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0950-z>.
- Güran, H. S. ve Öksüztepe, G. (2013). “Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts”. *Letters in Applied Microbiology*, 57(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/lam.12088>.
- Haberbeck, L. U., da Silva Riehl, C. A., Salomão, B. D. C. M. ve De Aragao, G. M. F. (2012). “*Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat”. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.021>.
- Haiko, J. ve Westerlund-Wikström, B. (2013). “The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence”. *Biology*, 2, 1242–1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>.
- Hamad, S. H., Al-Amer, J. J. ve Al-Otaibi, M. M. (2013). “Assessment of the Microbiological Quality and Wash Treatments of Lettuce Produced in Hofuf City, Saudi Arabia”. *Asian Journal of Plant Pathology*. 7(2), 84-91. <https://doi.org/10.17311/ajppaj.2013.84.91>.
- Hammond, E. N. ve Donkor, E. S. (2013). “Antibacterial effect of Manuka honey on *Clostridium difficile*”. *BMC Research Notes*, 6(188), 1-5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-188>.

- Hampikyan, H., Bingol, E. B., Muratoglu, K., Akkaya, E., Cetin, O. ve Colak, H. (2018). "The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates". *Meat Science*, 139, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.020>.
- Han, Y., King, J. ve Janes, M. E. (2018). "Detection of antibiotic resistance toxigenic *Clostridium difficile* in processed retail lettuce". *Food Quality and Safety*, 2(1), 37-41. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx032>.
- Harnvoravongchai, P., Chankhamhaengdecha, S., Ounjai, P., Singhakaew, S., Boonthaworn, K. ve Janvilisri, T. (2018). "Antimicrobial effect of asiatic acid against *Clostridium difficile* is associated with disruption of membrane permeability". *Frontiers in Microbiology*, 9:2125, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02125>.
- Harnvoravongchai, P., Pipatthana, M., Chankhamhaengdecha, S. ve Janvilisri, T. (2017). "Insights into drug resistance mechanisms in *Clostridium difficile*". *Essays in Biochemistry*, 61(1), 81–88. <https://doi.org/10.1042/EBC20160062>.
- Heise, J., Witt, P., Maneck, C., Wichmann-Schauer, H. ve Maurischat, S. (2021). "Prevalence and phylogenetic relationship of *Clostridioides difficile* strains in fresh poultry meat samples processed in different cutting plants". *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109032. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109032>.
- Holt, H. M., Danielsen, T. K. ve Justesen, U. S. (2015). "Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027". *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(11), 2243-2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>.
- Holý, O. ve Chmelař, D. (2012). "Oxygen tolerance in anaerobic pathogenic bacteria". *Folia microbiologica*, 57(5), 443-446.
- Hoover, D. G. ve Rodriguez-Palacios, A. (2013). "Transmission of *Clostridium difficile* in foods". *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), 675–685. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1842>.
- Horev, B., Sela, S., Vinokur, Y., Gorbatshevich, E., Pinto, R. ve Rodov, V. (2012). "The effects of active and passive modified atmosphere packaging on the survival of

Salmonella enterica serotype Typhimurium on washed romaine lettuce leaves”. *Food Research International*, 45(2), 1129-1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.037>

Ibrahim, H. A., Abdullah, M. A. A., EL-Desuki, M. ve Bakry, M.O. (2019). “Effect of some postharvest treatments on quality and storability of iceberg lettuce”. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 8(1), 12-20.

Ijabadeniyi, O. A., Mbedla, A. ve Ajayeoba, T. A. (2020). “Microbiological quality and antimicrobial efficacy of combined oregano essential oil and acetic acid on fresh lettuce”. *Italian Journal of Food Science*, 32(2). <https://doi.org/10.14674/IJFS-1566>.

Irkin, R., Carikci, S., Akalin, S. ve Batu, Z. (2021). “Decontamination effects of lemon peel and mint leaf extracts on salad vegetables”. *Journal of Food & Nutrition Research*, 60(2).

Isenberg, H. (1992). “Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods”. *Clinical microbiology procedures handbook*.

Isidro, J., Mendes, A. L., Serrano, M., Henriques, A. O. ve Oleastro, M. (2017). “Overview of *Clostridium difficile* infection: life cycle, epidemiology, antimicrobial resistance and treatment”. S. Enany, (ed). *Clostridium difficile- A comprehensive overview*. IntechOpen, İngiltere. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69053>.

Jaiswal, A. K. ve Jaiswal, S. (2015). “Modelling the effects of natural antimicrobials as food preservatives”. In: Taylor M. (ed.). *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 259-284, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, United Kingdom. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00012-8>.

Jaiswal, A. K., Gupta, S. ve Abu-Ghannam, N. (2012). “Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment”. *Food Chemistry*, 131(1), 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.032>.

Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V. ve Rupnik, M. (2016). “Highly divergent *Clostridium difficile* strains isolated from the environment”. *PLoS ONE*, 11(11), e0167101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>.

- Janoir, C. (2016). “Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection”. *Anaerobe*, 37, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>.
- Jia, C. G., Xu, C. J., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G. F., Wang, B. L. ve Wang, Q. M. (2009). “Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets”. *Food Chemistry*, 114:28–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.009>.
- Johansen, B., Duval, R. E., Sergere, J. C. (2020). “Antimicrobial Spectrum of Titrolean™: A New Potent Anti-Infective Agent”. *Antibiotics* (Basel), 9(7), 391. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070391>.
- Joshi, K., Mahendran, R., Alagusundaram, K., Norton, T. ve Tiwari, B. K. (2013). “Novel disinfectants for fresh produce”. *Trends in Food Science & Technology*, 34(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.008>.
- Justin, S. ve Antony, B. (2016). “Antibacterial activity of the essential oils of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Perry (Clove), *Myristica fragrans* Houtt. (Nutmeg) and *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger) against clinical isolates of *Clostridium difficile*: An *in vitro* study”. *International Journal of Contemporary Medical Research*, 3(4), 1085-1089.
- Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E. L. ve Wang, C. Y. (1989). “Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(1), 1-30. <https://doi.org/10.1080/10408398909527490>.
- Kerr, H. (2009). Commercial household disinfectant inactivation of *Bacillus cereus* spores on fruit and vegetable surfaces. *Masters Theses*, University of Tennessee, Knoxville
- Kevenk, T. O., Uyanık, T., Kanat, S., Çadırcı, Ö. ve Gücükoğlu, A. (2021). “Presence of *Clostridium perfringens* in traditional Turkish chicken doner kebabs and determination of the cpa and cpe Genes by mPCR”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1–18. <https://doi.org/10.33988/auvfd.839517>.
- Kint, N., Alves Feliciano, C., Martins, M. C., Morvan, C., Fernandes, S. F., Folgosa, F., Dupuy, B., Texeria, M. ve Martin-Verstraete, I. (2020). “How the anaerobic enteropathogen *Clostridioides difficile* tolerates low O₂ tensions”. *Molecular Biology and Physiology (ASM)*, 11(5), e01559-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01559-20>.

- Kint, N., Morvan, C. ve Martin-Verstraete, I. (2022). “Oxygen response and tolerance mechanisms in *Clostridioides difficile*”. *Current Opinion in Microbiology*, 65, 175-182.
- Kłapeć, T., Wójcik-Fatla, A., Cholewa, A., Cholewa, G. ve Dutkiewicz, J. (2016). “Microbiological characterization of vegetables and their rhizosphere soil in Eastern Poland”. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(4), 559-565. <https://doi.org/10.5604/12321966.1226846>.
- Koluman, A., Melikoğlu-Gölcü, B., Derin, O., Özkök, S. ve Anniballi, F. (2013). “*Clostridium botulinum* in honey: Prevalence and antibiotic susceptibility of isolated strains”. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(6), 706–711. <https://doi.org/10.3906/sag-1211-39>.
- Kong, J. O., Lee, S. M., Moon, Y. S., Lee, S. G. ve Ahn, Y.J. (2007). “Nematicidal Activity of Cassia and Cinnamon Oil Compounds and Related Compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae)”. *The Journal of Nematology*, 39(1), 31-36.
- Kotila, S. M., Pitkanen, T., Brazier, J., Eerola, E., Jalava, J., Kuusi, M., Könönen, E., Laine, J., Miettinen, I. T., Vuento, R. ve Virolainen, A. (2013). “*Clostridium difficile* contamination of public tap water distribution system during a waterborne outbreak in Finland”. *Scandinavian Journal of Public Health*, 41(5), 541–545. <https://doi.org/10.1177/1403494813481648>.
- Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K. ve Nychas, G. E. (1999). “A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial”. *International Journal of Food Microbiology*, 49(1-2), 63-74. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00054-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00054-9).
- Landelle, C., Verachten, M., Legrand, P., Girou, E., Barbut, F. ve Buisson, C. B. (2014). “Contamination of healthcare workers' hands with *Clostridium difficile* spores after caring for patients with *C. difficile* infection”. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(1), 10-15. <https://doi.org/10.1086/674396>.
- Lawrence, H. A. ve Palombo, E. A. (2009). “Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), 1590-1595.

<https://doi.org/10.4014/jmb.0904.04016>.

- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. ve Finegold, S. M. (2016). “Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prevot 1938”. *Anaerobe*, 40, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- Lawson, P. A., ve Rainey, F. A. (2016). “Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1009-1016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000824>.
- Lawson, P.A., 2016. “The taxonomy of the genus *Clostridium*: current status and future perspectives”. *Microbiology China*, 43 (5), 1070-1074.
- Le Lay, C., Dridi, L., Bergeron, M. G., Ouellette, M. ve Fliss, I. (2016). “Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination”. *Journal of Medical Microbiology*, 65(2), 169-175. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000202>.
- Leila, A., Nafiseh, Z., Samira, N., Saseed, P., Mohammad, G. ve Hajar, A. (2021). “Correction to: Evaluation of the shelf life of minimally processed lettuce packed in modified atmosphere packaging treated with calcium lactate and heat shock, cysteine and ascorbic acid and sodium hypochlorite”. *Food Measure*, 15, 4438-4445. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01073-8>.
- Lilly, T., Solomon, H. M. ve Rhodehamel, E. J. (1996). “Incidence of *Clostridium botulinum* in vegetables packaged under vacuum or modified atmosphere”. *Journal of Food Protection*, 59(1), 59–61. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.1.59>.
- Lim, S. C., Collins, D. ve Riley, T. (2020). “Environmental sources of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in the hospital”. *International Journal of Infectious Diseases*, 101, 274-275. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.720>.
- Lim, S. C., Foster, N. F., Elliott, B. ve Riley, T. V. (2018). “High prevalence of *Clostridium difficile* on retail root vegetables, Western Australia”. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 585–590. <https://doi.org/10.1111/jam.13653>.
- Lim, S. C., Knight, D. R., Moono, P., Foster, N. F. ve Riley, T. V. (2020). “*Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches and garden mixes with evidence of a clonal

- relationship with historical food and clinical isolates”. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 672–680. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12889>.
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L. ve Kendall, P. (2007). “Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado”. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>.
- Løkke, M. M. (2012). Postharvest quality changes of leafy green vegetables. Doctoral Thesis. Aarhus University, Department of Food Science, Denmark.
- López-Gálvez, F., Allende, A., Truchado, P., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J. A., Selma, M. V. ve Gil, M. I. (2010). “Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation”. *Postharvest Biology and Technology*, 55(1),53-60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.001>.
- Löfmark, S., Edlund, C. ve Nord, C. E. (2010). “Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections”. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 16–23. <https://doi.org/10.1086/647939>.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J. ve Li, M. (2019). “Developing natural products as potential anti-biofilm agents”. *Chinese Medicine*, 14(11), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>.
- MacLeod-Glover, N. ve Sadowski, C. (2010). “Efficacy of cleaning products for *C difficile*: Environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*–associated diarrhea in geriatric rehabilitation”. *Canadian Family Physician*, 56(5), 417-423.
- Mahajan, P. V. ve Goswami, T. K. (2001). “PH—Postharvest technology: enzyme kinetics based modelling of respiration rate for apple”. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 79(4), 399-406. <https://doi.org/10.1006/jaer.2001.0718>.
- Malamou-Ladas, H., O'farrell, S., Nash, J. Q., ve Tabaqchali, S. (1983). “Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards”. *Journal of Clinical Pathology*, 36(1), 88-92. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.1.88>.
- Manolopoulou, H., Lambrinos, G., Chatzis, E., Xanthopoulos, G. ve Aravantinos, E. (2010). “Effect of temperature and modified atmosphere packaging on storage quality of

- fresh-cut romaine lettuce”. *Journal of Food Quality*, 33, 317-336. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00321.x>.
- Martin-Diana, A. B., Rico, D., Barry-Ryan, C., Frias, J. M., Mulcahy, J. ve Henehan, G. T. (2005). “Calcium lactate washing treatments for salad-cut Iceberg lettuce: Effect of temperature and concentration on quality retention parameters”. *Food Research International*, 38(7), 729-740. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.005>.
- McFarlane, M. ve Hajkovicz, K. (2013). “Controlling *Clostridium difficile*”. *Australian Prescriber*, 36(4), 121-124. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2013.046>.
- Mcheik, A., Awad, A., Fadel, A., Mounzer, C. ve Nasreddine, S. (2018). “Effect of irrigation water quality on the microbial contamination of fresh vegetables in the Bekaa Valley, Lebanon”. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 6(6), 191–197. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20180606.16>.
- Metcalf, D. S., Costa, M. C., Dew, W. M. V. ve Weese, J. S. (2010). “*Clostridium difficile* in vegetables, Canada”. *Letters in Applied Microbiology*, 51(5), 600–602. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02933.x>.
- Mirtaghi, S. M., Torbati Nejad, P., Mazandarani, M., Livani, F. ve Bagheri, H. (2016). “Evaluation of antibacterial activity of *Urtica dioica* L. leaf ethanolic extract using agar well diffusion and disc diffusion methods”. *Medical Laboratory Journal*, 10(5), 15-21.
- Moono, P., Lim, S. C. ve Riley, T. V. (2017). “High prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* in public space lawns in Western Australia”. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep41196>.
- Moore, P., Kyne, L., Martin, A. ve Solomon, K. (2013). “Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure”. *Journal of Medical Microbiology*, 62(9), 1405-1413. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056614-0>.
- Mooyottu, S., Kollanoor-Johny, A., Flock, G., Bouillaut, L., Upadhyay, A., Sonenshein, A. L. ve Venkitanarayanan, K. (2014). “Carvacrol and trans-cinnamaldehyde reduce *Clostridium difficile* toxin production and cytotoxicity *in vitro*”. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 15-30. <https://doi.org/10.3390/ijms15034415>.

- Morvan, C., Folgosa, F., Kint, N., Teixeira, M. ve Martin-Verstraete, I. (2021). “Responses of *Clostridia* to oxygen: from detoxification to adaptive strategies”. *Environmental Microbiology*, 23(8), 4112-4125. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15665>.
- Mory, F., Alauzet, C., Matuszeswski, C., Riegel, P. ve Lozniewski, A. (2009). “Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria”. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1923-1926. <https://doi.org/10.1128/JCM.01778-08>.
- Mullish, B. H. ve Williams, H. R. T. (2018). “*Clostridium difficile* infection and antibiotic-associated diarrhoea”. *Clinical Medicine*. 18(3), 237-241. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-237>.
- Nastou, A., Rhoades, J., Smirniotis, P., Makri, I., Kontominas, M. ve Likotrafiti, E. (2012). “Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables”. *International Journal of Food Microbiology*, 159(3), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.003>.
- Ndlovu, S. (2020). “*Enterobacteriaceae* quality and diversity of vegetables sold in the Johannesburg Metropolis”. Doctoral dissertation. University of South Africa, South Africa.
- Nikaeen, M. Dehnavi, H. A., Hssanzadeh, A. ve Jalali, M. (2015). “Occurrence of *Clostridium difficile* in two types of wastewater treatment plants”. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(7), 663–665. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2014.12.005>.
- Nikzad, N. ve Parastar, H. (2021). “Evaluation of the effect of organic pollutants exposure on the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using UV–Vis spectrophotometry and chemometrics”. *Microchemical Journal*, 170, 106632. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106632>.
- Nousiainen, L. L., Joutsen, S., Lunden, J., Hänninen, M. L. ve Fredriksson-Ahomaa, M. (2016). “Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland”. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.020>.

- Num, S. M. ve Useh, N. M. (2014). “*Clostridium*: pathogenic roles, industrial uses and medicinal prospects of natural products as ameliorative agents against pathogenic species”. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 81-94. <https://doi.org/10.12816/0008220>.
- Numberger, D., Riedel, T., McEwen, G., Nübel, U., Frentrup, M., Schober, I., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Grossart, H. P. ve Greenwood, A. D. (2019). “Genomic analysis of three *Clostridioides difficile* isolates from urban water sources”. *Anaerobe*, 56, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.002>.
- Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. ve Abadias, M. (2012). “Presence and survival of *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water”. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014>.
- Oluwaseun, O., Singleton, I. ve Sant’Ana, A. S. (2020). “Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review”. *Food Microbiology*, 73, 177-208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>.
- Oren, A. ve Rupnik, M. (2018). “*Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: Two validly published and correct names”. *Anaerobe*. 52, 125-126. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.005>.
- Öksüz, H. B., Buzrul, S. (2021). “Mikroorganizmaların büyüme eğrilerini tanımlamak için excel tabanlı, kullanıcı dostu, ücretsiz bir araç: ÖK-BUZ GRoFiT”. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (3), 521-532. <https://doi.org/10.33462/jotaf.853435>.
- Ölmez, H. (2016). “Foodborne pathogenic bacteria in fresh-cut vegetables and fruits”. P. Kotzekidou, (ed). *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*, 151–166. Academic Press, United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00009-1>.
- Ölmez, H. ve Kretschmar, U. (2009). “Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact”. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>.
- Özcakmak, S. ve Gul, O. (2017). “Inhibition kinetics of *Penicillium verrucosum* using

- different essential oils and application of predictive inactivation models”. *International Journal of Food Properties*, 20, 684-692. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1308953>.
- Özcan, G. ve Demirel Zorba, N. N. (2016). “Combined effect of ultrasound and essential oils to reduce *Listeria monocytogenes* on fresh produce”. *Food Science and Technology International*, 22(4), 353-362. <https://doi.org/10.1177/1082013215604478>.
- Özdikmenli, S. ve Demirel Zorba, N. N. (2016). “Evaluation of usage of essential oils instead of spices in meat ball formulation for controlling *Salmonella* spp”. *Food Science and Technology International*, 22(2), 93-101. <https://doi.org/10.1177/1082013215571118>
- Özseven, A. G., Sesli-Cetin, E. ve Özseven, L. (2012). “Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu?”. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(3), 410–420.
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E. T., Patel, J. ve Mandrell, R. E. (2011). “Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce. A review”. *Advances in Agronomy*, 113, 75-141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386473-4.00002-6>.
- Pahariya, P., Fisher, D. J. ve Choudhary, R. (2022). “Comparative analyses of sanitizing solutions on microbial reduction and quality of leafy greens”. *LWT*, 154, 112696. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112696>.
- Park, H. W., Chen, G., Hwang, C. A. ve Huang, L. (2021). “Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* using gaseous chlorine dioxide—A kinetic analysis”. *Food Microbiology*, 95, 103707, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103707>.
- Park, S. H., Choi, M. R., Park, J. W., Park, K. H., Chung, M. S., Ryu, S. ve Kang, D. H. (2011). “Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce”. *Journal of Food Science*, 76(6), M293-M298. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02205.x>.

- Pasquale, V., Romano, V., Rupnik, M., Capuano, F., Bove, D., Aliberti, F., Krovacek, K. ve Dumontet, S. (2012). “Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs”. *Food Microbiology*, 31, 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.001>.
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y. W. ve Sun, X. (2017). “Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing”. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998–2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-16>.
- Pereira, F. C., Saujet, L., Tomé, A. R., Serrano, M., Monot, M., Couture-Tosi, E., Martin-Verstraete, I. ve Henriques, A. O. (2013). “The spore differentiation pathway in the enteric pathogen *Clostridium difficile*”. *PLoS Genetics*, 9(10), e1003782. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003782>.
- Perumalsamy, S., Putsathit, P. ve Riley, T. V. (2019). “High prevalence of *Clostridium difficile* in soil, mulch and lawn samples from the grounds of Western Australian hospitals”. *Anaerobe*, 60, 102065. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.018>.
- Ponce, A. G., Del Valle, C. ve Roura, S. I. (2004). “Shelf life of leafy vegetables treated with natural essential oils”. *Journal of Food Science*, 69(2), 50-56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb15515.x>.
- Portillo-Ruiz, M. C., Sánchez, R. A. S., Ramos, S. V., Muñoz, J. V. T. ve Nevárez-Moorillón, G. V. (2012). “Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based Medium”. *Journal of Food Science*, 77(8), 441-445. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02821.x>.
- Poxton, I. R., Mccoubrey, J. ve Blair, G. (2001). “The pathogenicity of *Clostridium difficile*”. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 421-427. https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl_3.13.
- Prazmowski, A., 1880. “Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger BacterienArten”. Inaugural Dissertation. Hugo Voigt, Leipzig, 1-58.
- Prescott, J. F., MacInnes, J. I. ve Wu, A. K. (2016). “Taxonomic relationships among the *Clostridia*. *Clostridial Diseases of Animals*”. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2016, 3-5.

- Primavilla, S., Farneti, S., Petruzzelli, A., Drigo, I. ve Scuota, S. (2019). “Contamination of hospital food with *Clostridium difficile* in Central Italy”. *Anaerobe*, 55, 8–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.008>.
- Rabold, D., Espelage, W., Sin, M. A., Eckmanns, T., Schneeberg, A., Neubauer, H., Möbius, N., Hille, K., Wieler, L. H., Seyboldt, C. ve Lübke-Bcker, A. (2018). “The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners”. *PLoS ONE*, 13(2), e0193411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193411>.
- Rahman, M. M., Azad, M. O. K., Uddain, J., Adnan, M., Ali, M. C., Al-Mujahidy, S. K. M. J., Roni, M. Z. K., Rahman, M. S., Islam, M. J., Rahman, M. H., Choi, K. Y. ve Naznin, M. T. (2021). “Microbial quality assessment and efficacy of low-cost disinfectants on fresh fruits and vegetables collected from urban areas of Dhaka, Bangladesh”. *Foods*, 10(6), 1325. <https://doi.org/10.3390/g10061325>.
- Rao, D. N ve Sachindra, N. M. (2002). “Modified atmosphere and vacuum packaging of meat and poultry products”. *Food Reviews International*, 18(4), 263-293. <https://doi.org/10.1081/FRI 120016206>.
- Rineh, A., Kelso, M. J., Vatansever, F., Tegos, G. P. ve Hamblin, M. R. (2014). “*Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics”. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(1), 131-150. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.866515>.
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J. ve Capita, R. (2021). “Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*”. *Biology*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>.
- Rodriguez-Palacios, A., Ilic, S., ve LeJeune, J. T. (2014). “*Clostridium difficile* with moxifloxacin/clindamycin resistance in vegetables in Ohio, USA, and prevalence meta-analysis”. *Journal of Pathogens*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158601>.
- Rodriguez-Palacios, A., Mo, K. Q., Shah, B. U., Msuya, J., Bijedic, N., Deshpande, A. ve Ilic, S. (2020). “Global and historical distribution of *Clostridioides difficile* in the human diet (1981–2019): Systematic review and meta-analysis of 21886 samples

- reveal sources of heterogeneity, high-risk foods, and unexpected higher prevalence toward the tropic”. *Frontiers in Medicine*, 7(9), 1-22. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00009>.
- Roshan, N., Riley, T.V. ve Hammer, K.A. (2017). “Antimicrobial activity of natural products against *Clostridium difficile in vitro*”. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 92–103. <https://doi.org/10.1111/jam.13486>.
- Roshan, N., Riley, T. V. ve Hammer, K. A. (2018). “Effects of natural products on several stages of the spore cycle of *Clostridium difficile in vitro*”. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 710-723. <https://doi.org/10.1111/jam.13889>.
- Rossi, C., Maggio, F., Casaccia, M., Chaves-López, C., Valbonetti, L., Serio, A. ve Paparella, A. (2022). “Comparing the effectiveness of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and two common household sanitizers to reduce lettuce microbiota and prevent *Salmonella enterica* recontamination”. *Journal of Food Safety*, 42(2), e12963. <https://doi.org/10.1111/jfs.12963>.
- Samarkos, M., Mastrogianni, E. ve Kampouroupoulou, O. (2018). “The role of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection”. *European Journal of Internal Medicine*, 50, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.02.006>.
- Sandhya, (2010). “Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs”. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.018>.
- Santos, M. I. S., Marques, C., Mota, J., Pedroso, L. ve Lima, A. (2022). “Applications of Essential Oils as Antibacterial Agents in Minimally Processed Fruits and Vegetables- A Review”. *Microorganisms*, 10(4), 760. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040760>.
- Santos, M. I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M. R., Nogueira, P. J., Pedroso, L. ve Ferreira, M. A. S. S. (2012). “Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal”. *Food Control*, 23(1), 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.022>.
- Scholar, E. (2007). “Vancomycin”. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 1-6. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62843-0>.

- Scholtzek, A. D., Heise, J., Witt, P., Hanuschik, A. M. ve Maurischat, S. (2022). “Contamination of home-grown and retail vegetables with *Clostridioides difficile*”. *Anaerobe*, 74, 102512. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102512>.
- Schuetz, A. N. (2014). “Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria”. *Clinical Infectious Diseases*, 59(5), 698-705. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu395>.
- Schvambach, M. I., Andriolli, B. V., Souza, P. F. D., Oliveira, J. L. B. ve Pescador, R. (2020). “Conservation of crisp lettuce in different post-harvest storage conditions”. *Revista Ceres*, 67, 256-262. <https://doi.org/10.1590/0034-737x202067040002>.
- Shahi, N., Min, B. ve Bonsi, E. A. (2015). “Microbial decontamination of fresh produce (strawberry) using washing solutions”. *Journal of Food Research*, 4(3), 128-137. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v4n3p128>.
- Shahverdi, A. R. Monsef-Esfahani, H. R., Tavasoli, F., Zaheri, A. ve Mirjani, R. (2007). “Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile in vitro*”. *Journal of Food Science*, 72(1), S055–S058. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00204.x>.
- Sharma, M., Lakshman, S., Ferguson, S., Ingram, D. T., Luo, Y. ve Patel, J. (2011). “Effect of modified atmosphere packaging on the persistence and expression of virulence factors of *Escherichia coli* O157: H7 on shredded iceberg lettuce”. *Journal of Food Protection*, 74(5), 718-726. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-427>.
- Shaughnessy, M. K., Bobr, A., Kuskowski, M. A., Johnston, B. D., Sadowsky, M. J., Khoruts, A. ve Johnson, J. R. (2016). “Environmental contamination in households of patients with recurrent *Clostridium difficile* infection”. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2686-2692. <https://doi.org/10.1128/AEM.03888-15>.
- Shilling, M., Matt, L., Rubin, E., Visitacion, M. P., Haller, N. A., Grey, S. F. ve Woolverton, C. J. (2013). “Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*”. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1079–1085. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0303>.

- Sholeh, M., Krutova, M., Forouzes, M., Mironov, S., Sadeghifard, N., Molaiepour, L., Maleki, A. ve Kouhsari, E. (2020). "Antimicrobial resistance in *Clostridioides (Clostridium) difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis". *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(158), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00815-5>.
- Simango, C. (2006). "Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(12), 1146–1150. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.01.009>.
- Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K. ve Strohshine, R. L. (2002). "Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce and baby carrots". *LWT-Food Science and Technology*, 35(8), 720-729. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0933>.
- Soetjipto, H., ve Martono, Y. (2017). "Plant essential oils potency as natural antibiotic in Indonesian medicinal herb of "jamu". In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 172(1), 012022.
- Song, I., Stine, S. W., Choi, C. Y. ve Gerba, C. P. (2006). "Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation". *Journal of Environmental Engineering*, 132(10), 1243–1248. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2006\)132:10\(1243\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:10(1243)).
- Sorg J.A. ve Dineen S.S., (2009). "Laboratory Maintenance of *Clostridium difficile*". *Current protocols in Microbiology*, 12(1):9A-1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09a01s12>.
- Sorg, J. A. ve Sonenshein, A. L. (2008). "Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores". *Journal of Bacteriology*. 190, 2505–2512. <https://doi.org/10.1128/JB.01765-07>.
- Southwell, I.A., Hayes, A.J., Markham, J. ve Leach, D.N.(1993). "The search for optimally bioactive Australian tea tree oil". *Acta Horti*, 344, 256–265. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.344.30>.
- Sönmezdag, A. S., Amanpour, A., Kelebek, H. ve Selli, S. (2018). "The most aroma-active compounds in shade-dried aerial parts of basil obtained from Iran and Turkey".

Industrial Crops and Products, 124, 692–698.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.053>.

Spigaglia, P., Barketi-Klai, A., Collignon, A., Mastrantonio, P., Barbanti, F., Rupnik, M., Janezic, S. ve Kansau, I. (2013). “Surface-layer (S-layer) of human and animal *Clostridium difficile* strains and their behaviour in adherence to epithelial cells and intestinal colonization”. *Journal of Medical Microbiology*, 62(9), 1386–1393.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.056556-0>.

Spigaglia, P., Mastrantonio, P. ve Barbanti, F. (2018). “Antibiotic resistances of *Clostridium difficile*”. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1050, 137–159.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_9.

Srisuwan, S., Mackin, K. E., Hocking, D., Lyras, D., Bennett-Wood, V., Voravuthikunchai, S. P. ve Robins-Browne, R. M. (2018). “Antibacterial activity of rhodomyrtone on *Clostridium difficile* vegetative cells and spores *in vitro*”. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 724–729.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.014>.

Steinmuller, N., Demma, L., Bender, J. B., Eidson, M. ve Angulo, F. J. (2006). “Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore”. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1596-1602.
<https://doi.org/10.1086/509576>.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. ve Švabić-Vlahović, M. (2000). “A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation”. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6).

Stevenson, E., Minton, N. P. ve Kuehne, S. A. (2015). “The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity”. *Trends in microbiology*, 23(5), 275-282.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>.

Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Gröhn, Y. T., Worobo, R. W., Wiedmann, M. ve Bergholz, P. W. (2013). “Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms”.

Applied and Environmental Microbiology, 79(2), 588-600.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02491-12>.

Sukmark, T., Rachtanapun, P. ve Rachtanapun, C. (2011). "Antimicrobial activity of oligomer and polymer chitosan from different sources against foodborne pathogenic bacteria". *Agriculture and Natural Resources*, 45(4), 636-643.

Swamy, M. K., Sayeed Akhtar, M. ve Sinniah, U. R. (2016). "Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-21.
<https://doi.org/10.1155/2016/3012462>.

Şengün, I. Y., Şentürk, S., Gül, S. ve Kılıç, G. (2021). "Potential of essential oil combinations for surface and air disinfection". *Letters in Applied Microbiology*, 72(5), 526-534. <https://doi.org/10.1111/lam.13445>

Taggart, M. G., Snelling, W. J., Naughton, P. J., La Ragione, R. M., Dooley, J. S. ve Ternan, N.G. (2021). "Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: novel systems linked to hypervirulence". *Plos Pathogens*, 17(9), 1-20.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009817>.

Taylan, G., Tosun, M.N. ve Zorba, N.N. (2020). The Risk of *Clostridium difficile* as a Foodborne Pathogen. *Frontiers in Bacteriology Research*. Adam C. Toft (Ed.). Nova Publishers. 93-147.

Temiz, A., Bağcı, U. ve Toğay, S. Ö. (2011). "Efficacy of different decontamination treatments on microbial population of leafy vegetables". *Gıda*, 36(1), 9-15.

Tijerina-Rodríguez, L., Villarreal-Trevino, L., Morfin-Otero, R., Camacho-Ortiz, A. ve Garza-Gonzalez, E. (2019). "Virulence factors of *Clostridioides (Clostridium) difficile* linked to recurrent infections". *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/7127850>.

Tiryaki, K. (2021). "Elektrolize su ve ultrases uygulamalarının modifiye atmosfer paketlenme ile taze çileğin depolama stabilitesine etkisi". Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale.

Tkalec, V., Janezic, S., Skok, B., Simonic, T., Mesaric, S., Vrabic, T. ve Rupnik, M. (2019). "High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes

- compared to some other vegetables in Slovenia”. *Food Microbiology*, 78, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.017>.
- Todd, J., Friedman, M., Patel, J., Jaroni, D. ve Ravishankar, S. (2013). “The antimicrobial effects of cinnamon leaf oil against multi-drug resistant *Salmonella* Newport on organic leafy greens”. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.021>.
- Tortajada-Girbés, M., Rivas, A., Hernández, M., González, A., Ferrús, M. A. ve Pina-Pérez, M. C. (2021). “Alimentary and pharmaceutical approach to natural antimicrobials against *Clostridioides difficile* gastrointestinal infection”. *Foods*, 10(5), 1124. <https://doi.org/10.3390/foods10051124>.
- Trombetta, D., Saija, A., Bisignano, G., Arena, S., Caruso, S., Mazzanti, G., Uccella, N., Castelli, F. (2002). “Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha,beta-unsaturated aldehydes”. *Letters in Applied Microbiology*, 35(4), 285-90. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01190.x>.
- Uhlig, E., Olsson, C., He, J., Stark, T., Sadowska, Z., Molin, G., Ahrne, S., Alsanius, B. ve Håkansson, Å. (2017). “Effects of household washing on bacterial load and removal of *Escherichia coli* from lettuce and “ready-to-eat” salads”. *Food Science & Nutrition*, 5(6), 1215-1220. <https://doi.org/10.1002/fsn3.514>.
- Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y. ve Tamura, Y. (2017). “Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs”. *Anaerobe*, 43, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.004>.
- Usui, M., Maruko, A., Harada, M., Kawabata, F., Sudo, T., Noto, S., Sato, T., Shinagawa, M., Takahashi, S. ve Tamura, Y. (2020). “Prevalence and characterization of *Clostridioides difficile* isolates from retail food products (vegetables and meats) in Japan”. *Anaerobe*, 61, 102132. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102132>.
- Uwamahoro, M. C., Massicotte, R., Hurtubise, Y., Gagné-Bourque, F., Mafu, A. A. ve Yahia, L. H. (2018). “Evaluating the sporicidal activity of disinfectants against *Clostridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* spores by using the improved methods based on ASTM E2197-11”. *Frontiers in Public Health*, 6(18), 1-6.

<https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00018>.

- Ünlü, M., Vardar-Unlu, G., Vural, N., Donmez, E. ve Cakmak, O. (2008). “Composition and antimicrobial activity of *Juniperus excelsa* essential oil”. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 129–131.
- Vargas-Arcila, M., Cartagena-Valenzuela, J. R., Franco, G., Correa-Londoño, G. A., Quintero-Vásquez, L. M. ve Gaviria-Montoya, C. A. (2017). “Changes in the physico-chemical properties of four lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties during storage”. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 257-273. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:632.
- Vermeulen, A., Ragaert, P., Rajkovic, A., Samapundo, S., Lopez-Galvez, F. ve Devlieghere, F. (2013). “New research on modified-atmosphere packaging and pathogen behaviour”, Sofos, J, (ed). In *Advances in Microbial Food Safety*, 340-354, Woodhead Publishing: United Kingdom.
- Vijayakumar, C. ve Wolf-Hall, C. E. (2002). “Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce”. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1646-1650. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.10.1646>.
- Villagómez-Estrada, S., Blanco, J. L., Melo-Duran, D., Martin, C., Harmanus, C., Kuijper, E. J. ve Garcis, M. E. (2019). “Detection of *Clostridium difficile* in the environment in a veterinary teaching hospital”. *Anaerobe*, 57, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.011>.
- Vuotto, C., Moura, I., Barbanti, F., Donelli, G. ve Spigaglia, P. (2016). “Subinhibitory concentrations of metronidazole increase biofilm formation in *Clostridium difficile* strains”. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(2), 1-7. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv114>.
- Wang, S., Kang, O. H. ve Kwon, D. Y. (2021). “Trans-cinnamaldehyde exhibits synergy with conventional antibiotic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2752. <https://doi.org/10.3390/ijms22052752>.
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S. ve Weese, S. J. (2017). “Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile*

- community-acquired infection?”. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 542-553.
<https://doi.org/10.1111/jam.13338>.
- Witkowska, I. M. (2013). Factors affecting the postharvest performance of fresh-cut lettuce. Doctoral Thesis, Wageningen University, Holland.
- Wright, G. D. ve Sutherland, A. D. (2007). “New strategies for combating multidrug-resistant bacteria”. *Trends in Molecular Medicine*, 13(6), 260–267.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004>.
- Xu, J. G., Meng, J., Bao, W. J., Kang, J. M., Chen, J. Y. ve Han, B. Z. (2021). “Occurrence of disinfectant-resistant bacteria in a fresh-cut vegetables processing facility and their role in protecting *Salmonella enteritidis*”. *RSC advances*, 11(17), 10291-10299.
<https://doi.org/10.1039/D0RA09325D>.
- Yang, J. ve Yang, H. (2019). “Non-antibiotic therapy for *Clostridioides difficile* infection: a review”. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 56(7), 493–509.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1648377>.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X. ve He, K. (2014). “Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis”. *Fitoterapia*, 92, 133–147.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>.
- Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S. ve Lo, Y. M. (2013). “Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on lettuce”. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(1), 87-96.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1301>.
- Yu, L. ve Shi, H. (2021). “Recent advances in anti-adhesion mechanism of natural antimicrobial agents on fresh produce”. *Current Opinion in Food Science*, 42, 8-14.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.009>.
- Zhou, X., Seto, S.W., Chang, D., Kiat, H., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K. ve Bensoussan A. (2016). “Synergistic effects of Chinese herbal medicine: A comprehensive review of methodology and current research”. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00201>.
- Zhu, D., Sorg, J. A. ve Sun, X. (2018). “*Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection”. *Frontiers in*

Cellular and Infection Microbiology, 8, 29.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029>.

Zhuang, H., Barth, M. M. ve Cisneros-Zevallos, L. (2014). “Modified atmosphere packaging for fresh fruits and vegetables”. Han, J. H, (Ed). *In Innovations in Food Packaging*, 445-473, Academic Press: United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00018-7>.

Zidaric, V, Rupnik M. (2012). *Clostridium difficile* in meat products, eggs and vegetables in Slovenia. In 4th International *Clostridium difficile* Symposium, 20-22 September, Bled, Slovenia, abstract: Poster 118.

Zwietering, M. H, Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Riet K. V. (1990). “Modeling of the bacterial growth curve”. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6),1875-1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>.