



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melis KOCA

İSPANAKTA GELİŞEN *ESCHERİCHIA*
COLI BİYOFİLMLERİNİN
TERMOSONİKASYON VE ORGANİK
ASİT MUAMELESİYLE
DEKONTAMİNASYONU

GIDA TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2024

T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSPANAKTA GELİŞEN *ESCHERİCHIA COLI*
BİYOFİLMLERİNİN TERMOSONİKASYON VE
ORGANİK ASİT MUAMELESİYLE
DEKONTAMİNASYONU

MELİS KOCA

GIDA TEKNOLOJİSİ
ANA BİLİM DALI

OSMANIYE
TEMMUZ-2024

TEZ ONAYI

ISPANAKTA GELİŞEN *ESCHERİCHIA COLI* BİYOFİLMLERİNİN TERMOSONİKASYON VE ORGANİK ASİT MUAMELESİYLE DEKONTAMİNASYONU

Melis KOCA tarafından Emel ÜNAL TURHAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN
Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Doç. Dr. Süleyman POLAT
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mevhibe TERKURAN
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Anabilim Dalı, OKÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Eyyup TEL
Enstitü Müdürü, **Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Melis KOCA



ÖZET

İSPANAKTA GELİŞEN *ESCHERİCHİA COLİ* BİYOFİMLERİNİN TERMOSONİKASYON VE ORGANİK ASİT MUAMELESİYLE DEKONTAMİNASYONU

Melis KOCA
Yüksek Lisans, Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

Temmuz 2024, 60 sayfa

Bu çalışmada, ıspanakta gelişen *Escherichia coli* biyofilmleri üzerine ultrasonikasyon ve organik asit muamelesinin etkisi araştırılmıştır. *E. coli* biyofilmi oluşturulan ıspanak yapraklarının dekontaminasyonu için farklı çözeltiler (PBS, laktik asit ve asetik asit), sıcaklık (20, 40 ve 50°C) ve sürelerdeki (2 ve 5 dakika) sonikasyon işlemine başvurulmuştur. Ispanakta gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerine sıcaklık, süre ve inaktivasyon çözeltilerinin etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Farklı koşullardaki sonikasyon işlemi ile ıspanaktaki *E. coli* biyofilmi canlı hücre sayısında 1.02 ve 6.03 log kob/cm² arasında azalış meydana gelmiştir. Ispanakta en yüksek *E. coli* biyofilm inaktivasyonu 50°C'de 5 dakika sonikasyon koşullarında laktik asit muamelesi ile sağlanırken en düşük biyofilm inaktivasyonu 20°C'de 2 dakika sonikasyon koşullarında PBS muamelesi ile sağlanmıştır. Standartlaştırılmış regresyon katsayılarına göre, bağımsız değişkenlerin biyofilm inaktivasyon oranı üzerindeki göreceli önem sırası, sıcaklık, çözeltiler ve süre olarak belirtilmiştir. Ispanağa uygulanan dekontaminasyon işlemlerinin duyu özellikleri üzerinde genellikle olumsuz bir etkisinin olmadığı ancak yüksek sıcaklıkta asetik asit ile muamele edilen örneklerde duyu beğenilerinin belirgin biçimde azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ıspanak gibi taze yapraklı sebzelerde etkili bir dekontaminasyon için laktik asit ve termosonikasyon muamelesi önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ispanak, Biyofilm, *Escherichia coli*, Termosonikasyon, Organik asit

ABSTRACT

DECONTAMINATION OF *ESCHERICHIA COLI* BIOFILMS ON SPINACH BY THERMOSONICATION AND ORGANIC ACID TREATMENT

Melis KOCA
M.Sc., Department of Food Technology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

July 2024, 60 pages

In this study, the effects of ultrasonication and organic acid treatment on *Escherichia coli* biofilms on spinach were investigated. Sonication process at different solution (PBS, lactic acid and acetic acid), temperature (20, 40 and 50°C) and time (2 and 5 minutes) was used for decontamination of spinach leaves with *E. coli* biofilm. The effects of temperature, time and inactivation solution on the inactivation of *E. coli* biofilm on spinach were found to be statistically significant ($p < 0.05$). With the sonication process under different conditions, reduction in viable cell counts of *E. coli* biofilm on spinach was changed between 1.02 and 6.03 log cfu/cm². The highest *E. coli* biofilm inactivation in spinach was achieved by lactic acid treatment under sonication conditions at 50°C for 5 minutes, while the lowest biofilm inactivation was achieved by PBS treatment under sonication conditions at 20°C for 2 minutes. According to standardized regression coefficients, the order of relative importance of the independent variables on the biofilm inactivation rate was indicated as temperature, solution, and time. It has been determined that decontamination processes applied to spinach generally do not have a negative effect on sensory properties, but sensory properties are significantly reduced in samples treated with acetic acid at high temperatures. As a result, lactic acid and thermosonication treatment have been suggested for effective decontamination of fresh leafy vegetables such as spinach.

Key Words: Spinach, Biofilm, *Escherichia coli*, Thermosonication, Organic acid



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince çalışmalarımın her aşamasında bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen ve bu konuda çalışma olanağı sağlayan Sayın Hocam Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tezimin laboratuvar çalışmaları kısmında desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT'a ve Arş. Gör. Dr. Nuray İNAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca yılmadan yorulmadan her zaman yanımda duran ve beni sonuna kadar destekleyen haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Sevgi KONAZ ve sevgili babam Devrim KONAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimde ve yüksek lisans eğitimimde beni destekleyip motive eden birlikte okuyup birlikte öğrendiğim sevgili eşim Esabil Emrah KOCA'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

TEZ BİLDİRİMİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1 Taze Meyve ve Sebzelerde Bakteriyel Biyofilmler	3
2.2 Taze Sebze ve Meyvelerde Dekontaminasyon	8
2.3 Organik Asit ve Sonikasyon Uygulamaları ile Dekontaminasyon	11
2.4 Ispanakta Mikrobiyel Kontaminasyon	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1 Patojen Bakteri ve Organik Asit Çözeltisi Ön Hazırlığı	19
3.2 Ispanak Örnekleri Ön Hazırlığı.....	20
3.3 Ispanak Örneklerinde Biyofilm Oluşumu	20
3.4 Ispanak Örneklerinin Farklı İnaktivasyon Çözeltileri ve Sonikasyon Koşulları ile Dekontaminasyonu.....	21
3.5 Ispanakta Gelişen <i>E. coli</i> Biyofilmlerindeki Canlı Hücre Sayısını Belirleme	21
3.6 Ispanak Örneklerinin Duyusal Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi	22
3.7 Ispanak Örneklerinin Mikroskopik Görüntüsü	23
3.8 İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1 Ispanak Yüzeyinde <i>E. coli</i> Biyofilm Gelişimi	26
4.2 Farklı İnaktivasyon Çözeltisi ve Sonikasyon Koşullarının Ispanak Yüzeyinde Gelişen <i>E. coli</i> Biyofilmleri Üzerine Etkisi	27
4.3 <i>E. coli</i> Biyofilm İnaktivasyonunun Regresyon Analizi ile Modellenmesi	31

4.4 Farklı İnaktivasyon Çözeltileri ve Sonikasyon Koşullarının İspanağın Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi.....	34
4.5 Farklı İnaktivasyon Çözeltileri ve Sonikasyon Koşullarının İspanağın Hücre Yapısı Üzerine Etkisi.....	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Ispanakta gelişen <i>E. coli</i> biyofilm inaktivasyonu bağımsız değişkenleri	21
Çizelge 4.1. Ispanak yüzeyindeki mikroorganizma yükü	27
Çizelge 4.2. Farklı koşullarda sonikasyona maruz bırakılan ıspanak yüzeyinde gelişen <i>E. coli</i> biyofilm sayısındaki azalış ($\log \text{ kob/cm}^2$)	30
Çizelge 4.3. Farklı koşullardaki sonikasyon uygulamasına maruz bırakılan ıspanakların duyuşal özellikleri.....	36
Çizelge 4.4 Farklı koşullardaki sonikasyon uygulamasına maruz bırakılan ıspanakların hücre boyutları (çap: μm)	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Biyofilm oluşum denemesi için hazırlanmış ıspanak yaprakları	20
Şekil 3.2. Ispanak yapraklarının farklı çözeltiler ve sonikasyon ile dekontaminasyonu	22
Şekil 3.3 Farklı çözeltiler ve ultrasound koşulları ile dekontaminasyondan sonra ıspanakların duyuşal analizi	23
Şekil 3.4. Ispanak yaprağında mikroskopik gözlem	24
Şekil 3.5. Ispanak hücresi mikroskopik görüntüsü	24
Şekil 4.1 Farklı sonikasyon koşullarında <i>E. coli</i> biyofilmi inaktivasyon oranı	31
Şekil 4.2 Gözlenen ve tahmin edilen biyofilm inaktivasyonu grafiğı.....	34
Şekil 4.3 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 20°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	38
Şekil 4.4 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 40°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	38
Şekil 4.5 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 50°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	39
Şekil 4.6 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 20°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	39
Şekil 4.7 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 40°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	39
Şekil 4.8 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 50°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

UV	Ultraviyole
kHz	Kilohertz
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
W	Watt
Kob	Koloni oluşturan birim
μ m	Mikrometre



1. GİRİŞ

Tüketicilerin sağlıklı gıdalara olan ilgileri düşük kalorili ancak vitamin, mineral ve lif kaynağı yüksek olan taze sebze ve meyve gibi ürünlere olan eğilimi arttırmıştır. Taze meyve ve sebzeler tüm dünyada insan beslenmesinin en önemli kısmını oluşturur (Kim, vd., 2011). Meyve ve sebzeler, özellikle C vitamini, tiamin, niasin, piridoksin, folik asit, mineraller ve diyet lifi kaynakları olarak insan beslenmesinde ve sağlığında önemli roller oynar. Taze meyve ve sebze ürünleri pazarı son on yılda dünya çapında sürekli olarak büyümüştür. Taze ürün tüketiminin artmasıyla birlikte gıda güvenliği ve halk sağlığı sorunları da kendini göstermeye başlamıştır (Hu, vd., 2017). Taze meyve ve sebzeler sağlıklı ve dengeli beslenmenin önemli bileşenleridir; kanser ve kalp-damar hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara karşı korunmak amacıyla birçok ülkede devlet sağlık kurumları tarafından tüketimleri teşvik edilmektedir. Bununla birlikte, meyve ve sebzelerin, özellikle de çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelerin, geleneksel olarak hayvansal kökenli gıdalarla ilişkilendirilen insan patojenlerinin bulaşmasında önemli araçlar olduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir (Berger, vd., 2010). Sebze yönünden zengin diyetler kanser ve kardiyovasküler hastalıkları önleme gibi yararlarından dolayı tercih edilirler. Sebze ve meyvelerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri için günde en az 5 porsiyon tüketimleri önerilmiştir (Yuk, vd., 2006). Marul, lahana, kereviz, ıspanak gibi yapraklı sebzeler az işlenmiş veya taze doğranmış sebzeler olarak adlandırılarak gıda endüstrisinde hazır doğranmış karışık salata tipi ürünlere kullanılırlar. Avrupa, Amerika ve Avustralya’da bu gibi ürünlerin kullanımı her geçen gün artmaktadır. Çok az işlemle geçip paketlenerek satılan bu gibi taze doğranmış sebzeler yıkama, kabuk soyma ve dilimleme gibi işlemlere maruz kalarak ürün kalitesi ve raf ömrü açısından iyileştirilmişlerdir. Bu gibi ürünlere bahsedilen bu işlem aşamaları mikrobiyel yükü indirgeme ve ürün güvenliğini sağlama bakımından oldukça önemlidir (Carmichael, vd., 1998; Cui, vd., 2018). Sebzelerin büyük kısmı besin içeriğinden daha fazla yararlanılabilmesi için çiğ olarak tüketilir ve bu durum taze sebzelerin güvenliği meselesini ortaya çıkarır (Kim, vd., 2011). Nitekim, sebze yapraklarının yüzeyinde bitkinin gelişimi veya çürümesi esnasında bakteriyel kolonizasyonun gerçekleşmesi ile gıda kaynaklı salgın riski artabilir. Ayrıca, sebzelerdeki yüksek besin miktarı, nem ve nötral pH’lar mikrobiyel gelişmeyi tetikleyebilir. Örneğin, ıspanak ve marul yaklaşık %8 karbonhidrat, %2 protein ve %88-95 nem içerir ve pH’ları 5.1-6.8 arasında değişir. Bu gibire sebzelere

patojen ve bozucu mikroorganizmalar bulaşarak gelişme fırsatı bulabilir. Özellikle de elverişsiz tarım uygulamalarının bir sonucu olarak çevreden sebzelere gıda kaynaklı patojen bulaşışı olabilir. Patojen bakterileri hayvanlardan ve kanalizasyon suyundan sulama sularına karışabilir, toprakta uzunca bir süre canlılığını koruyarak bitkilere bulaşabilir. Ayrıca çapraz kontaminasyonla sulama sistemlerinden, proses ekipmanlarından ve toplama esnasında insanlardan dolayı ortaya çıkabilir. Bitki yüzeylerinde meydana gelen mikrobiyel kolonizasyon sonucu mikroorganizma bitki yüzeyine iyice tutunup biyofilm olarak adlandırılan daha dirençli bir mikrobiyel yapıyı oluşturabilir (Carmichael, vd., 1998; Cui, vd., 2018). Bitki yüzeyleri çeşitli mikroorganizmalar için doğal bir yaşam alanıdır. Meyve ve sebze mikroflorası; bitkinin genotipinden (bitki çeşidi), fizikokimyasal koşullardan, bitki yüzey yapılarından ve ayrıca sıcaklık, bitki örtüsü, yağış, rüzgâr ve güneş radyasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenir. Sebze ve meyvelerde ayrıca tarım uygulamaları, hasat sonrası işleme ve depolama koşullarının da mikroflora üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Carter ve Brandl, 2015).

Son yıllarda çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelerde patojen bakteri (*Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes*) bulaşışı kaynaklı ölümlerle bile sonuçlanan hastalıklar rapor edilmiştir (Kim, vd., 2011; Johannessen, vd., 2014; Jose, vd., 2014). Bu bakımdan, salatalarda kullanılacak olan yeşil yapraklı sebzelerin tüketimden önce etkili bir yıkama ile mikrobiyel yükünün indirgenmesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Taze sebzelerde mikrobiyel yükü indirgerken ürünün duysal kalite özelliklerini de sürdürmesi beklenmektedir. Bu nedenle taze yapraklı sebzelerde patojen inaktivasyonu için en uygun yöntemler uygulanmaya çalışılmaktadır. Taze ürün sanitasyonu için kullanılan veya üzerinde çalışılan mevcut sanitasyon tekniklerinin bazı örnekleri şunlardır: Işınlama, farklı elektrolize su türleri, ılık su, klor dioksit, ultrason, asitleştirilmiş sodyum klorit, ozon, organik asitler ve hidrojen peroksit'dir. Taze meyve ve sebze dekontaminasyonunda bu yöntemler arasında çoğunlukla kimyasal muamelesine başvurulmuş ancak son dönemde güvenli inaktivasyon yöntemlerinden biri olan ultrasonikasyon uygulaması üzerinde de durulmaya başlanmıştır. Yine taze yapraklı sebzelerde antimikrobiyel madde olarak organik asitlerin kullanımını öneren çalışmalara rastlanılmış ve özellikle de bu organik asitlerin güvenli olarak kabul edilmesi (GRAS) yani sağlık üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmaması tüketiciler tarafından da tercih nedeni olmuştur. Taze meyve

sebzelerde ultrasonikasyon ve organik asitlerin kombine uygulanması ile ise daha iyi bir dezenfeksiyon sağlanabileceği bildirilmiştir (Chaudry, vd., 2004; Al-Haq, vd., 2005; Klaiber, vd., 2005; Huang, vd., 2006; Yuk, vd., 2006; Ugarte-Romero, vd., 2006; Ruiz-Cruz vd., 2007; Alexandre, vd., 2011; Huang ve Chen, 2011; Alexander, vd., 2012).

Bu çalışmada, ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* biyofilmlerine karşı farklı sıcaklık ve sürelerde sonikasyon ve organik asit muamelesinin etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Taze Meyve ve Sebzelerde Bakteriyel Biyofilmler

Taze ürün tüketiminden kaynaklanan gıda kaynaklı hastalık salgınlarının sayısı son yirmi yılda önemli ölçüde artmıştır (Sivapalasingam, vd., 2004). 1990-2005 yılları arasında taze ürünler 713 salgınla ilişkilendirilmiş ve bu da 34049 hastalık vakasıyla sonuçlanmıştır (DeWaal ve Bhuiya, 2007). Bu artışın çeşitli nedenleri öne sürülmekle birlikte, birinci neden kişi başına düşen taze ürün tüketiminin önemli ölçüde artmasıdır. ABD'de 1982 ile 1997 yılları arasında çiğ meyve ve sebze tüketimi sırasıyla %18 ve %29 oranında artmıştır (Garrett, vd., 2003). İkinci neden, taze meyve sebze ürün endüstrisi, büyük miktarlarda ürünün dünya çapında taşınmasıyla giderek daha küresel hale gelmiştir. Üçüncü neden ise, taze kesilmiş meyveler ve paketli salatalar gibi hazır gıdaların tüketiminin katlanarak artmasıdır. Yemeğe hazır olan paketlenmiş bu gibi ürünler, hazırlandıkları ürünün bütün yani işlem görmemiş olanına göre mikrobiyel büyümeye ve bozulmaya daha fazla açık hale gelir. Özellikle de taze meyve ve sebzelerde biyofilm oluşumu gıda güvenliği açısından daha çok risk oluşturur (Brandl, 2008).

Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri ekzopolimerik yapıda jelse bir tabaka içine gömülü halde birbirlerine, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye tutunarak oluşturdukları topluluk olarak tanımlanır. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumu gıdalarda bozulmalara, gıda işleme ekipmanlarında hasarlara ve patojen kontaminasyonları ile hastalıklara neden olduğu için istenmeyen bir durumdur. Biyofilmlerin gıda endüstrisinde oluşum mekanizmaları oldukça hızlıdır. Biyofilm oluşumundaki ilk iki adım, malzemenin yüzeyinin koşullandırılması ve hücrelerin bu yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanmasıdır. Daha

sonra bağlanma geri döndürülemez hale gelir ve mikro kolonilerin gelişimi başlar. Son olarak biyofilmin üç boyutlu yapısı oluşur ve dağılmaya hazır karmaşık bir ekosistem ortaya çıkar (Nikolaev ve Plakunov, 2007; Srey, vd., 2013; Coughlan, vd., 2016). Gıda endüstrisi açısından özellikle önemli olan, gıda fabrikası ortamlarında biyofilm oluşturan bazı türlerin insan patojenleri olmasıdır. Bu patojenler, paslanmaz çelik, polietilen, ahşap, cam, polipropilen, kauçuk vb. gibi gıda endüstrisinde yaygın olan malzemeler üzerinde biyofilm yapıları geliştirebilmektedir (Abdallah, vd., 2014; Colagiorgi, vd., 2017). Biyofilm gelişiminin ağırlıklı olarak görüldüğü yerler gıda işletmesi türüne göre değişmekle birlikte su, süt ve diğer sıvı boru hatları, pastörizatör plakaları, ters ozmoz membranları, çalışma tezgâhları, çalışan eldivenleri, ambalaj malzemeleri, ham maddeler ve katkı maddeleri için depolama siloları ve dağıtım sistemleri olarak sıralanır (Camargo, vd., 2017).

Gıda endüstrisindeki biyofilmler sağlık sorunlarına ve ciddi ekonomik kayıplara da neden olabilmektedir. Gıda üretim yüzeylerinde biyofilmlerin varlığı, metal yüzeylerin bazı bakteriler tarafından korozyona uğratılmasıyla birlikte bu parçaların değiştirilmek zorunda olması ile sonuçlanır ve böylece maddi kayıplar meydana gelir. Ayrıca *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp., gibi bazı bakteri türleri de hoş olmayan kokular (kokmuş) ve tatlar (acı) üretebilen birçok farklı proteolitik ve lipolitik enzim salgılar. Bu gibi durumlarda, etkilenen üretim partilerinin kaldırılması ve imha edilmesi gerekir. Öte yandan, daha hayati bir endişe kaynağı olan gıda fabrikalarında biyofilm oluşumu çok önemli bir halk sağlığı sorununu temsil etmektedir. Patojenler; gıda zehirlenmelerine (*B. cereus*, *S. aureus*) ve bazı durumlarda gastroenterite (*E. coli*, *S. enterica*) ve sistemik hastalıklara (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*) neden olabilir (Gallie, vd., 2018). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 2013 yılında hayvansal olmayan gıdalardaki patojenlerin oluşturduğu riske ilişkin bilimsel bir görüş yayınlamış ve buna göre 2007 ve 2011 yılları arasında toplanan gıda kaynaklı salgınlarda çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden kaynaklı *Salmonella* spp. ve *E. coli* varlığına dikkat çekilmiştir (Doyle ve Erickson, 2008).

Patojen bakteriler bitkilerin yüzeylerine tutunma ve kolonileşme yeteneğine sahiptir. Patojenlerin bitki yüzeyine bağlanması ile birlikte oluşturdukları biyofilmleri basit bir yıkama işlemi ile ortadan kaldırmak mümkün değildir (Annous, vd., 2001). Bitki yüzeylerindeki bakterilerin yüzde 30 ile 80'i biyofilmlerin içinde bulunur (Lindow ve

Brandl, 2003). Bitki yüzeylerinde biyofilm oluşumunu tetikleyen en önemli faktörler; sıcaklık değişimleri, kuruma, UV ve oksidatif stres'tir. Bu faktörler karşısında bakterinin hayatta kalma stratejisi ise biyofilm oluşumuna yönelmesidir (Fett ve Cooke, 2003). Bakteriye virülans genellikle biyofilm yapısında gözlemlenen kitle algılama mekanizması ile kontrol edilmektedir. Kitle algılama biyofilmdeki bakterilerin diğer biyofilm üretmemiş formdaki bakterilere göre besin maddelerine daha üstün erişimini sağlayan bir sistemdir ve biyofilm oluşumunu bu şekilde kontrol eder (Nadell, vd., 2011).

Taze ürünlerde bulunan mikrobiyotayı etkileyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler vardır. pH, sıcaklık ve nem gibi fiziksel faktörler mikrobiyotanın büyümesini ve bazı metabolik aktivitelerini etkiler. Kimyasal faktörler, sebzelerde mikroorganizmalar tarafından kullanılacak besin maddelerinin bulunabilirliğini ve besin maddelerini içerir. Son olarak, biyolojik faktörler rekabetçi mikrobiyotanın varlığını ve bakteri-bitki etkileşimlerini içerir (Sela, 2009). Taze ürünler, çiftlik ile sofraya arasındaki üretim zincirinin herhangi bir noktasında kontamine olabilir. Ürün kontaminasyonunun özellikle tarlada, hasat sırasında, ilk işleme sırasında ve mutfakta oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Ailes, vd., 2008). Çiğ sebzelerin *E. coli* dahil çeşitli patojen mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonuna tarımsal faktörler (organik gübre, sulama suyu, toprak ve pestisit ve böcek ilaçlarının püskürtülmesi) ve hasat sonrası uygulamalar (taşıma, toplama, yıkama, işleme, nakliye ve paketleme) neden olmaktadır (Beuchat, vd., 2002; Iturriaga, vd., 2007; Rajwar, vd., 2016; Huang, vd., 2018). Toprak ve yanlış kompostlanmış hayvan gübresi, hasat öncesi ana kontaminasyon faktörlerinden bir diğeridir. Toprak, hayvan atıklarının eklenmesi nedeniyle patojenik *E. coli* de dahil olmak üzere çok çeşitli patojenler için doğal bir rezervuardır (Whipps, vd., 2008). *E. coli* O157: H7 toprak tipine, nem seviyesine ve sıcaklığa bağlı olarak toprakta 7 ila 25 hafta kadar, hasattan sonra ise mahsulün depolanması veya dağıtım sırasında da hayatta kalabilir (Duffy, vd., 2005). Taze kesilmiş ürünlerde hasat işlemleri sırasında kesme (marul, elma ve armut), parçalama (havuç, lahanaya), dilimleme (domates) veya soyma (havuç, portakal) nedeniyle oluşan mekanik yaralanma meydana gelir ve bu durum enterik patojenlerin daha kolay bağlanabileceği yüzeyler yaratır. Ürünün kesilmiş yüzeyleri ayrıca, biyofilm oluşturan bakteriler tarafından kolaylıkla kullanılan, besin yüklü sıvıların büyük miktarlarını da serbest bırakır (Hu, vd., 2017).

Bazı durumlarda, taze ıspanak ve çiğ yonca filizleri gibi sebzelerde *E. coli*'nin varlığı, hasat sonrası son aşamalarda, başlangıç aşamalarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir (Frank, 2011). Hasat sonrası süreçte yıkama, soğutma tankları, spreyle ve buzun nakliyesi gibi birçok aşamada su kullanılır. Yıkama işlemi sebzelerdeki ve bazı mikroorganizmalardaki toprak ve kalıntıların uzaklaştırılması için gereklidir. Sulama suyunun uygulanma yöntemi (salma, sprey sulama, damlama sulama ve alttan sulama) aynı zamanda patojenlerin büyüyen sebzelere girişini de arttırabilir (FDA, 1998). Sudaki herhangi bir kirlenme doğrudan mahsullerin yenilebilir yaprakları üzerinde biriktiğinden, taşkın ve sprey sulama en büyük riski temsil eder (FDA, 1998). Buna rağmen, eğer kullanılan su kirliyse, yıkama, dilimleme, ıslatma, paketlenme ve hazırlama işlemleri *E. coli*'nin sebzelere bulaşmasının asıl kaynağı olabilir. Taze ürünlerin depolandığı hidro soğutucularda kirli suyun kullanılması bitkisel kontaminasyona neden olabilir (Gagliardi, vd., 2003). Yeşil yapraklı sebzelerin (salatalar) hazırlanması sırasında *E. coli* ile olası kontaminasyonun diğer kaynakları arasında paketleyiciler tarafından kullanılan su banyoları veya boşaltma tankları ve depolama sırasında soğutma eksikliği yer almaktadır (Duffy, vd., 2005). Ayrıca restoranlarda veya ev mutfaklarında sebzelerin kirli aletlerle hazırlanması durumunda gıda kontaminasyonu meydana gelebilir. Hasat öncesi dönemde, yetersiz kompostlanmış hayvan gübresinin uygulanmasıyla bazı patojenler çevreye aktarılabilir (Berger, vd., 2010). Aktif kömür, ters ozmoz, membran filtrasyonu, klorlama, ozonlama ve UV ışınlanması gibi arıtma ve dezenfeksiyon sistemleri yoluyla geri kazanılan suyun riski azaltılabilir; ancak bazı sistemler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genellikle pahalıdır (Hamilton, vd., 2006). Dünya Sağlık Örgütü, gıdaların *E. coli* ve diğer enteropatojenler tarafından kontaminasyonunu önlemek için 5 temel adım önermektedir: (1) çiğ ve pişmiş gıdaları ayırmak, (2) çalışma alanını temiz tutmak, (3) pişirmek (yiyecekleri iyice pişirmek), (4) yiyecekleri güvenli sıcaklıklarda tutmak ve (5) güvenli su ve hammadde kullanmak (WHO, 2018).

Genel olarak enterik patojenler genellikle dağıtım süresi boyunca ürünlerde hayatta kalma kapasitesine sahiptir. Depolama sırasında ürün üzerindeki enterik patojenlerin varlığı, sıcaklık, bağıl nem, atmosferin gazlı bileşimi, besin varlığı ve rekabetçi bakteri veya antimikrobiyal bileşikler dahil olmak üzere depolama koşullarına bağlıdır. Ayrıca ürüne verilen hasar genellikle kontamine patojenlerin canlılığını ve büyümesini arttırır (Hu, vd., 2017). Tarım, işleme ve dağıtım uygulamalarındaki hem tedarik hem

de ürün yelpazesini geliştiren değişiklikler (örneğin, önceden paketlenmiş yeşil yapraklı sebzelerin üç kez yıkanması) artan salgın hastalık riskini de beraberinde getirmiştir (Berger, vd., 2010). *E. coli* O157:H7'nin ıspanakta kontamine topraktan ziyade özellikle kirli su kullanımı ile kolonize olduğu bulunmuştur (Mitra, vd., 2009).

Böcekler de olası bir kontaminasyon kaynağıdır. Özellikle de sığır çiftliği yakınındaki tarlalarda, sığır çiftliklerinden kaynaklı patojen ile kontamine sineklerin, bakterileri doğrudan bitki yapraklarına veya meyvelerine aktardığı bildirilmiştir (Iwasa, vd., 1999; Sela, vd., 2005; Talley, vd., 2009).

Gıda endüstrisinde bir yüzeye tutunma ve biyofilm oluşturma yeteneği ile bilinen önemli gıda kaynaklı patojen bakteriler *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* ve *Escherichia coli* olarak sıralanmıştır. Biyofilmler antimikrobiyel maddelere karşı planktonik hücrelerden daha dirençli oldukları için daha etkindirler ve inaktivasyon denemeleri sırasında göz ardı edilmemeleri gerekir (Turhan, vd., 2016, 2017). Gıda patojenlerinin planktonik hücrelerinin taze sebze ve meyvelerden inhibisyonu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Ancak, bu patojen bakterilerin taze sebzelerde oluşturdukları biyofilmler ve riskleri üzerinde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Elhariry, 2011).

E. coli, Gram negatif, *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde *Escherichia* genusuna bağlı, fakültatif anaerob, çoğunlukla hareketli, sporsuz, çubuk şeklinde bir bakteridir. *E. coli* enfeksiyonu; ishal, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom gibi gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilir. Oluşturduğu sağlık risklerinin yanı sıra biyofilmleri, gıda endüstrisi için en büyük tehditlerden ve zorluklardan biridir (Lencova, vd., 2022). *E. coli* O157:H7, tarım ortamındaki yaygın dağılımı nedeniyle, sulama suyu, toprak ve hayvan dışkı yoluyla taze meyve ve sebzelerde hızla yayılabileceği gibi, hasat, nakliye ve depolama sırasında çapraz bulaşma yoluyla da yayılabilmektedir. Ayrıca meyve ve sebzelerin stomalarında, epidermislerinde ve damarlarında tutunma ve kolonizasyon sonrasında kolayca biyofilm oluşturabilir, bu da *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu gıda zehirlenmesi riskini büyük ölçüde artırır (Yaron ve Romling, 2014). Sebzelerde *E. coli* O157:H7 bulaşısı özellikle sulama aşamasında görülmektedir. Sulama yöntemlerinden damlama sulamanın yağmurlama sulamaya göre bulaş riskini düşürdüğü bildirilir (Solomon, vd., 2002b).

Escherichia coli O157:H7 salgını özellikle de fekal kontaminasyona maruz kalan taze meyve ve sebze gibi ürünlerin tüketimi ile ilişkilendirilmiştir. Amerika'da 1998 ve 2006 yılları arasında yemeye hazır doğranmış sebzelerin *E. coli* kontaminasyonundan kaynaklanan 18 gıda zehirlenmesi salgını rapor edilmiştir. 2012 yılında Amerika'daki 5 eyalette görülen *Escherichia coli* O157:H7 salgınının taze yeşil yapraklı sebzelerin tüketiminden kaynaklandığı bildirilmiştir (Almasoud, vd., 2015). Epidemiyolojik bulgulara göre *E. coli* salgını genellikle salatalık, havuç ve marul tüketimi sonucu görülmüştür (Cui, vd., 2018). *E. coli*'nin marul, lahanası, ıspanak ve diğer yapraklı sebzeler üzerinde gıda zehirlenme riskini daha da arttıran biyofilm oluşturabilmesi salgın riskini daha da tehlikeli bir boyuta taşıyabilir. Biyofilmlerde *E. coli* O157:H7 varlığı artan antimikrobiyel dirençten dolayı gıda hijyeni açısından ciddi bir problemdir. Gıda endüstrisinde *E. coli* biyofilmlerinin kontaminasyon riskini azaltmada kimyasal antimikrobiyel ajanlar yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak gıda ürünlerindeki kimyasal kalıntıların varlığı konusunda tüketiciler her geçen gün daha bilinçli olmaya başlamış ve gıda güvenliği açısından riskli bulmuştur. Halk sağlığı açısından riskli olmayan güvenli antimikrobiyel kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır. *E. coli* biyofilmlerinin yok edilmesinde insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi olmayan doğal yöntemlerin geliştirilmesi gıda kaynaklı hastalık salgınının kontrolünde elzem olarak görülmüştür (Cui, vd., 2018). Son günlerde yazılı ve görsel basında taze yapraklı sebzelerin tüketimi sonucu *E. coli* O157:H7 kaynaklı ölüme dahi varan vakalar bildirilmiş ve bu konunun önemine dikkat çekilerek gerek evsel kullanımlarda gerekse işletmelerde bu bakterinin inaktivasyonu ile ilgili güvenlik önlemleri alınması gerektiği vurgulanmıştır. Hastalık kontrol ve önleme merkezinden alınan verilere göre en yüksek düzeyde *E. coli* salgını 200 insanda hastalığın görülmesi ile rapor edilmiştir. 16 Mayıs 2018 tarihi itibarıyla ise 25'den fazla insanın *E. coli*'den etkilendiği ve 5 kişinin *E. coli* O157:H7 bulaşmış marul tüketimi sonucu öldüğü bildirilmiştir. Görüldüğü üzere çiğ olarak tüketilen taze yapraklı sebze tüketimi ile birlikte *E. coli* salgın vakaları rapor edilmiştir (The Centers for Disease Control and Prevention-CDC).

2.2 Taze Sebze ve Meyvelerde Dekontaminasyon

Meyve ve sebzelerde gıda güvenliğini sağlamadaki öncelikli hedef patojen bakteri bulaşmasını önlemektir. Taze meyve ve sebzelerde kontaminasyonu önlemeye yönelik

olarak, iyi hijyen uygulamaları (GHP), iyi tarım uygulamaları (GAP) ve kritik kontrol noktalarında tehlike analizi (HACCP) gibi yöntemlere başvurulur (Johannesen ve Cunjoe, 2014). Ancak bu yöntemlerin kombine etkileri veya biyofilmler üzerindeki etkileri üzerinde yeterince durulmamıştır (Goodburn ve Wallace, 2013; Joshi, vd., 2013; Srey, vd., 2014). Taze meyve ve sebzelerde gıda kaynaklı patojenleri azaltarak mikrobiyel güvenliği sağlamaya yönelik olarak ise, fiziksel kontrol (ısıtma, ultrasonikasyon, UV-V, ışınlama ve soğuk oksijen plazma), kimyasal kontrol (klorin, klorin dioksit, hidrojen peroksit, etanol, ozon ve organik asit), yeni teknolojiler (elektrostatik sprey, elektrolize su, darbeli ışık, esansiyel yağlar, bakteriyosinler, bakteriyofajlar, gümüş ve hidrojen peroksit) ve kombine yöntemler olmak üzere çeşitli kontrol stratejileri denenmiştir. Son zamanlarda yapılan yeni çalışmalarda özellikle de kombine yöntemlerin antagonistik, sinerjik etkilerinin araştırılması önerilmiştir. Ürün özelliklerinin korunması açısından fiziksel yöntemler üzerinde durulması da önerilmiştir. Ayrıca çalışmalarda indikatör mikroorganizmalar üzerinde değil doğrudan patojen mikroorganizmalar üzerinde durulması önerilmiştir (Parish, vd., 2003).

Çapraz kontaminasyonu sınırlamak için darbeli elektrik alan, darbeli ışık ve sonikasyon gibi fiziksel yöntemler ve klor veya peroksit bazlı dezenfektanlar gibi kimyasal metotlar önerilmiştir (Virto, vd., 2005). Kimyasal dezenfektanlar, maliyet etkinliği, proses ekipmanının geniş ölçekli olması, uygulama ve kontrol kolaylığı nedeniyle proses suyu ve ekipmanlarının sanitasyonu için sıklıkla tercih edilmektedir. Önemli avantajlarına rağmen, çeşitli kimyasal dezenfektanların temel sınırlamaları şunları içerir: (a) organik içerik varlığında sınırlı verimlilik; (b) zararlı yan ürün üretimi ve (c) eklenen dezenfektanın yeniden kullanılmasını sağlayacak bir yenileme döngüsünün bulunmaması (Nieuwenhuijsen, vd., 2000; Van Haute, vd., 2013).

Roka ve taze soğanın limon suyu ve sirke (1/1 sudaki çözeltileri) ile 15 dakika yıkanması *Salmonella* spp. miktarında azalmaya neden olmuştur (Şengün ve Karapınar, 2005). Havuçlarda yine bu çözeltilerin *Salmonella* spp. inaktivasyonunda oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Sengun ve Karapınar, 2004). Bozucu mikroorganizmalarla kontamine edilen marulun klor, ozon veya bunların kombinasyonu ile işlenmesi sonucu canlı mikroorganizma sayısında azalma görülmüştür (Garcia, vd., 2003). Ayrıca klor ve ozon kombinasyonları marulun raf

ömürünü arttırmıştır. Marulun durulanması sırasında durulama suyunun bulanıklığında veya kalitesinde herhangi bir azalma gözlenmemiş, bu da ticari işlemlere uygulanabilirliğini göstermiştir (Garcia, vd., 2006).

Mikrobiyel kontaminasyonu azaltmada etkili olan bir diğer yöntem de iyonlaştırıcı radyasyondur. Özellikle yeşil yapraklı sebzelere odaklanan çalışmalar, marul ve ıspanak gibi sebzelerde iyonlaştırıcı radyasyon muamelesi ile *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 inhibisyonudur (Niemira, vd., 2003; 2007; 2008).

Mikrobiyel kontaminasyonu indirgemedede kullanılan metodun etkinliği; muamele tipi, hedef mikroorganizmanın fizyolojisi ve çeşidi, ürün yüzeyinin karakteristiği, muamele zamanı, sıcaklığı, süresi, pH'sı, konsantrasyonu vb. birçok faktöre bağlıdır. Mikrobiyel inaktivasyon sağlanırken ürün karakteristiğinin ve duyuşal özelliklerinin de korunması veya kabul edilebilir düzeylerde tutulması beklenmektedir. Bu bakımdan gıda özelliklerini koruyan kombine yöntemlerin uygulandığı inaktivasyon yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır (Parish, vd., 2003). Örneğın, taze kesilmiş meyve ve sebzelerin güvenliği konusunda artan endişelerle birlikte, taze kesilmiş ürünlerdeki mikrobiyel yükü azaltmak için klor dioksit, hidrojen peroksit, asidik elektrolize su gibi çeşitli sanitasyon maddeleri kullanılmış ancak bu ajanların patojenleri tamamen ortadan kaldırmadıkları, yalnızca azalttığı ve sıklıkla taze kesilmiş ürünlerin kalitesi ve raf ömrü üzerinde önemli olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Sethi, vd., 2019). Bu yüzden sinerjik etki yaratacak inaktivasyon yöntemlerinin birlikte kullanılması ile hem dekontaminasyon hem de duyuşal kabul edilebilirliğin sağlanması hedeflenmiştir (Zhang, vd., 2022).

Karvakrol, timol, sinnalaldehit, öjenol ve linoleik asit gibi doğal antimikrobiyel ajanların tek başına veya kombine olarak uygulanması, taze kesilmiş sebze endüstrisindeki önceki çalışmalarda rapor edilmiş ve bakteriyel membranın stabilitesini ve sitoplazmik membranların yüzey proteinlerini bozarak birçok patojen ve bozucu bakterinin kontrolünde faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Davidson, vd., 2013; Cacciatore, vd., 2015). Başka bir çalışmada, sineol ve karvakrol'un *E. coli*'ye karşı sinerjistik inhibisyon etkisi saptanmıştır. Bu antimikrobiyel kombinasyonları bakterilerin hücre zarı geçirgenliğini artırabilir, nükleik asit ve proteinlerin normal fonksiyonunu bozabilir ve virülans genlerinin transkripsiyon seviyesini inhibe ederek patojenitesini zayıflatabilir (Addo, vd., 2023).

Taze sebzelerde özellikle de ilk adım olarak gerek istenmeyen kirliliklerden gerekse de mikroorganizmalardan kurtulmak için su ile yıkama elzemdir. Ayrıca kimyasal dezenfektanlarla da yaklaşık 3 logaritmik birim mikrobiyel inhibisyon sağlanabilmektedir. Her geçen gün daha da gelişen doğranmış ve paketlenmiş taze ürün endüstrisi taze sebzelerin sanitasyonu ve yıkanması ile ilgili olarak yeni teknolojilerin veya yöntemlerin denenmesini gerekli kılmıştır. Nitekim farklı sanitizerler ve yıkama tekniklerinin etkinliğini değerlendirmek için pilot ve laboratuvar çalışmaları üzerinde durulmaya başlanmıştır (Ssemanda, vd., 2018). Taze ürünlerde bu patojenleri yok etmede geleneksel yıkama yöntemleri tek başına yeterli olmamaktadır ve bu yüzden yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Zhao, vd., 2017). Klorin bazlı kimyasal koruyucular gıda endüstrisinde gerek düşük maliyetleri gerekse de inaktivasyondaki etkinlikleri nedeniyle uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak bu gibi kimyasallar kanserojenik yan ürünler oluşturarak sağlık üzerinde olumsuz etkiler bırakabilirler ve bu durum gıdalardaki mikrobiyel kontaminasyonu azaltmada daha güvenli doğal koruyucu ihtiyacını doğurmuştur. Laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler uzun yıllardan beri kullanılan doğal koruyucular arasında yer almaktadır. Hatta birçok organik asit meyve ve sebzelerin yapısında doğal olarak bulunmaktadır (Alborzi, vd., 2018).

2.3 Organik Asit ve Sonikasyon Uygulamaları ile Dekontaminasyon

Organik asitler gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonunda sağlık üzerinde negatif etkisi olmadığı için sıklıkla tercih edilir (Kim, vd., 2011). Organik asitlerin özellikle de çiğ olarak tüketilen taze meyve ve sebzelerin temizliğinde çok iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Antimikrobiyel madde olarak organik asitlerin tercih edilme nedenlerinin başında ekonomik olmaları, sağlık üzerinde negatif etkilerinin olmamaları, gıdanın duyuşsal özelliklerini pek fazla değiştirmemeleri gibi olumlu özellikleri yer almaktadır (Parish, vd., 2003; Ssemanda, vd., 2018). Organik asitlerin antimikrobiyel aktivitesi kullanılan organik asit çeşidine göre değişiklik gösterir. Taze sebze ve meyvelerin dekontaminasyonunda sıklıkla başvuruşan organik asitler sitrik asit, asetik asit, laktik asit, askorbik asit ve malik asittir. Organik asitlerin taze sebzelere bulaşan *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, ve *L. monocytogenes* üzerinde antibakteriyel etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Akbaş ve Ölmez, 2007; Park vd., 2011; Amrutha vd., 2017). Organik asitlerin taze sebzelerdeki mikrobiyel yükü 1-3 log

düzeylerinde indirgeyebildiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Yuk, vd., 2006; Ölmez ve Temur, 2010; Kim, vd., 2011; Nastou vd., 2012).

Ayrışmamış organik asit molekülleri serbestçe mikrobiyel hücre zarına nüfuz eder ve hücre içi pH'yı düşürerek bakterileri inhibe eder. Organik asitlerin antimikrobiyel etki mekanizmasında düşen gastrik pH patojen bakterinin istemediği koşullara neden olur ve böylece mikroorganizma inhibe olur (Amrutha, vd., 2017). Organik asitlerin inhibitör özellikleri; konsantrasyonlarına, bakteri hücre duvarına nüfuz etme yeteneklerine ve mikrobiyel sitoplazmik pH'ı değiştirme kapasitelerine bağlıdır (Midolo, vd., 1995; Eswaranandam, vd., 2004). Organik asitler arasındaki etkinlik farklılıkları moleküler boyutlarına da bağlanabilir (Ganesh, vd., 2010). Organik asitler gibi doğal antimikrobiyallerin, otoindüktör-2 molekülünün ekspresyonunu inhibe etme yeteneği olduğu ve böylece *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* Typhimurium dahil olmak üzere patojen bakterilerin kitle algılama yeteneğini engellediği bildirilmiştir. Tek başına %4.0 laktik asit ve %4.0 malik asit + %4.0 laktik asit kombinasyonu, ıspanak ve kavun üzerinde *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella*'nın AI-2 (furanosil borat diester) aktivitesini engellediği bildirilir. Bu nedenle, dondurulmuş veya soğutulmuş sebze ve meyveler ile salata karışımlarıyla uğraşan minimum düzeyde işlenmiş ürün endüstrisinde gıda güvenliği, bu doğal antimikrobiyaller kullanılarak artırılabilir. Organik asitler, mikroorganizmaların sinyal molekülleri yoluyla iletişimini kırmakta ve biyofilm oluşumunun da önüne geçmektedir (Almasoud, vd., 2016).

Akbaş ve Ölmez (2007), marulda *E. coli* ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu için kullandıkları sitrik asit ve laktik asit çözeltileri (%0.5, 2 dakika) ile 1.5-2 log kob/mL düzeyinde inhibisyonu başarmışlardır. Park, vd. (2011) marul ve elmaya bulaşan *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu için probiyonik asit, laktik asit, malik asit, sitrik asit ve asetik asit çözeltilerini kullanarak etkili bir dekontaminasyon sağlamışlardır. Meyve sebzelerde organik asitlerin mikrobiyel inaktivasyonunda daha çok planktonik formlar üzerinde çalışılmakla birlikte biyofilmler üzerindeki etkilerine dair çalışmalar sınırlı bulunmuştur. Marul ve lahanadaki *L. monocytogenes* biyofilmlerinin inaktivasyonu ile ilgili rastlanan bir çalışmada organik asitlerin (%2 sitrik asit, malik asit, laktik asit, 5 dakika muamele) maruldaki *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde 0.1-0.5 log düzeyinde lahanada ise 2.5-3.5 log düzeyinde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (Srey, vd., 2014). %2

malik asit ve laktik asitin ıspanakta oluşan *E. coli* biyofilmlerini inaktive etmede (3-4 logaritmik birim düzeyinde indirgeme) etkili olduğu bildirilmiştir (Almosoud, vd., 2015). Taze sebzelerde ürün karakteristiklerini değiştirmeden en etkili inhibisyonun sağlandığı organik asit konsantrasyonunun %2 olduğu bildirilmiştir. %3-6 arasında konsantrasyonlarla yine aynı düzeylerde inaktivasyon gözlemlendiği ve %2 konsantrasyonla arasında fark olmadığı bildirilmiştir. %6'nın üzerindeki konsantrasyonlarda ise organik asitlerin ürün karakteristiğini değiştireceği ve bu yüzden çok yüksek konsantrasyonların uygulanmaması gerektiği bildirilmiştir (Srey vd., 2014; Amrutha, vd., 2017).

Malik asidin havuç ve diğer gıdayla temas eden yüzeylerde *S. enterica* serovar Typhimurium biyofilminin inhibisyonunda etkili olduğu bildirilir (Over, vd., 2009; Singla, vd., 2014). Daha önceki çalışmaların birinde; *E. coli* için asetik asit, sitrik asit ve laktik asidin MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri sırasıyla %1.5, %2 ve %0.2 olarak kaydedilirken *Salmonella* için ise; sırasıyla %1, %1.5 ve %1 olduğu bildirilmiştir. Sonuçlara göre %2'lik laktik asidin, asetik ve sitrik asitle karşılaştırıldığında mikroorganizmaları etkisizleştirmede en etkili organik asit olduğu sonucuna varılmıştır (Amrutha, vd., 2017). Aynı çalışmada salatalığa %2 laktik asit uygulanması ile 6 günlük bir süre boyunca depolamadan sonra hem *E. coli* hem de *Salmonella* sp. yükünde düşüş olduğu bildirilmiştir (Amrutha, vd., 2017).

Ultrasonikasyon, uygulanması kolay ve ekonomik olmasından dolayı gıda endüstrisindeki mikrobiyel yükü azaltmada kullanılan yeni yöntemlerden biridir. Ultrasonikasyon mikrobiyolojik kirliliklerin yanı sıra fiziksel kirlilikleri temizleme amacıyla da kullanılabilir. Ultrasonikasyon temizleme işlemi sayesinde çeşitli yüzeylerde biriken yağ ve kirlerin arındırılması mümkün olmuştur. Paslanmaz çelikten yapılmış olan temizleme tanklarına ultrasonik transdüserlerin yerleştirilmesiyle temizleme işleminin etkinliğinin artırılması mümkün olmuştur (Yakut, vd., 2009). Ultrason, insan kulağının algılayamayacağı kadar yüksek (>16 kHz) frekanstaki ses dalgaları tarafından üretilen bir enerji şeklidir (Jayasooriya, vd., 2004). Sıklıkla kullanılan termal olmayan bir gıda işleme teknolojisi olan ultrason, son yıllarda güçlü mekanik salınım, üstün penetrasyon ve yön kontrol edilebilirlik gibi özel avantajlarından dolayı patojen biyofilmlerin inaktivasyonunda tercih edilir (Yu, vd., 2020). Düşük frekanslı ve yüksek yoğunluklu ultrasonik alana maruz kalma

durumunda bakteriyel biyofilmin hücre dışı polimerik maddeleri, güçlü mekanik titreşim ve akustik akış etkisi ile yok edilir (Yu, vd., 2020). Ek olarak, ultrasonun neden olduğu akustik kavitasyon, antibakteriyel aktivitesini daha da artırabilecek bir dizi mekanik strese ve kimyasal etkiye de neden olabilir. Örneğin, ultrasonik ışınlama sırasında akustik kavitasyonun oluşturduğu aşırı yüksek sıcaklık ve basınç, termal etkileri tetikleyebilir ve mikroorganizmaları daha da etkisiz hale getirebilir (Piyasena, vd., 2003). Yüksek yoğunluklu ve düşük frekanslı ultrasonun, güçlü mekanik titreşimi ve akustik kavitasyonundan dolayı bakteriyel biyofilmi önemli ölçüde ortadan kaldırdığını bildiren çalışmalar vardır (Yu, vd., 2020).

Ultrasonun mikrobiyel inaktivasyon mekanizması; kavitasyon ve serbest radikal üretimine dayanır. Kavitasyonda hücre duvarının tahrip edilmesi, hücrenin zayıflaması (incelmesi), hücre duvarı kırılması ve stoplazma içeriğinin açığa çıkması, por oluşumu, hücre zarı tahribatı ve hücre yıkımı gibi olaylar gerçekleşir. Serbest radikal oluşumu ise kırıklar, çatlaklar ve ufalanmalar ile DNA'ya zarar verir (Jose, vd., 2014; Chen, vd., 2020). Ultrason uygulaması ile mikroorganizmalar tutundukları yüzeyden alınıp serbest forma geçebilir ve antimikrobiyel madde uygulaması daha etkili olabilir. Ultrason uygulamasının maliyet, üretkenlik ve seçicilik, daha iyi proses süresi, gelişmiş kalite, azalan kimyasal zarar ve fiziksel riskler gibi pek çok avantajları vardır. Özellikle de son yıllarda çevreye zarar vermeyen yeşil teknoloji uygulamaları ile birlikte çevresel sürdürülebilirlikteki rolünden dolayı dikkat çekmektedir (Nishikawa, vd., 2010; Erriu, vd., 2014; Majid, vd., 2015; Mamvura, vd., 2018). *S. aureus*, *L. innocua*, *S. enteritidis*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *Bacillus* spp. gibi gıda patojenlerinin inaktivasyonunda ultrasondan yararlanılabileceği bildirilmiştir (Piyasena, vd., 2003; Brimpa, vd., 2013; Chen, vd., 2020).

Bilindiği üzere ultrason ile lökale mekanik ve kimyasal enerjiyi üreten baloncukların oluşumu, gelişimi ve çöküşü ile inaktivasyon sağlanır. Ultrason ile mikrobiyel hücre ölümündeki temel mekanizma fiziksel etkidir. Ayrıca hidrojen peroksit gibi reaktif bileşiklerin üretimi de mikrobiyel tahribata neden olabilir. Gıda endüstrisinde mikrobiyel inaktivasyonda genellikle yüksek enerjili, düşük frekanslı (20-100 kHz) ultrasondan yararlanılır (Sango, vd., 2014; Jiang vd., 2020). Mikroorganizmaların inaktivasyonu kavitasyonun bir sonucudur. Kavitasyon olayı ile ortaya çıkan bu enerji özellikle de meyve ve sebzelere tutunan (biyofilm yapısı) mikrobiyel hücreleri ortadan

kaldırmada etkilidir. Ultrason güçlü bir dezenfeksiyon sağlayabilir. Ancak büyük çaplı mikrobiyel kontaminasyon durumunda özellikle de dirençli formdaki biyofilm oluşumu halinde diğer inaktivasyon yöntemleriyle kombine uygulanması önerilmektedir. Benzer olarak kimyasal maddeler tek başına özellikle de biyofilm yapısı içinde hapsolmuş olan mikroorganizmaları yok etmede yeterli olmayabilmektedir. Böyle bir durumda ultrason uygulaması ile mikroorganizmalar tutundukları yüzeyden alınıp serbest forma geçebilir ve kimyasal muamelesi daha etkili olabilir. Bu sebepten ötürü özellikle de sebze ve meyvelerin yüzeyindeki biyofilm inaktivasyonunda ultrason önerilmektedir. Laboratuvarlarda kullanılan 2 tip ultrason ekipmanı vardır. Bunlar ultrasonik banyo ve ultrasonik probdur. Ultrasonik banyolar genellikle katı dispersiyoni veya materyalleri temizlemede kullanılır. Ekonomiktir ve kullanımı kolaydır. 20 L'den 2500 L'ye kadar değişen kapasitelerde ekipmanlar mevcuttur. Ultrasonik banyoda direkt bu ekipmanların duvarlarında yerleşmiş halde bulunan (çeperlerinde) transdüserler vardır ve ultrasonik enerji doğrudan bu banyo içinde bulunan sıvıya aktarılır. Bu tip ultrason genellikle 40 kHz de çalışır ve sabit seviyelerde yüksek yoğunluklar üretir. Sıvının derinliği bu yoğunlukların devamlılığı için önemlidir ve sıvıdaki ultrason dalga boyunun yarısından daha düşük olmamalıdır. Ultrasonik problarda ise çubuk şekilli metal bir boru sesi kuvvetlendirmek için kullanılır ve ortamda yüksek enerjili akustik vibrasyonu iletir. Bu sistemin daha yüksek enerjili olduğu düşünülür çünkü ultrasonik enerji probun ucundaki küçük bir yüzeyden açığa çıkarılır ve prob uygulama haznesine daldırılabilir. Ancak bu sistem küçük hacimli örneklerde kullanılabilir ve örnekte hızlıca sıcaklık yükselmesine neden olabileceğinden çok dikkat edilmesi gerekir (Nishikawa, vd., 2010; Jose, vd., 2014). Laboratuvar çalışmalarında genellikle ultrason banyolarından yararlanılmaktadır. Gıda veya ortam pH'sının düşük olması ultrason ile daha iyi bir inaktivasyona neden olmuştur. Özellikle de taze sebze ve meyvelere bulaşan *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Aeromonas* bu gıdaları tüketen insanlarda endişeyi de beraberinde getirmiştir. Gıda endüstrisinin en önemli sorunlarından biri taze tüketilen meyve sebze gibi ürünlerdeki mikrobiyel bulaşlar olmuş ve gıda endüstrisi mikrobiyel bulaşları indirgemek için yeni yöntemler aramışlardır. Ultrason bu yeni yöntemlerden biridir ve birçok araştırmacı tarafından bu yöntemin mikrobiyel inaktivasyonda etkili olduğu saptanmıştır. Meyve ve sebzelere bulaşan *E. coli* ve *L. monocytogenes* gibi önemli

gıda kaynaklı patojenlerin ultrason muamelesi ile inaktive edilebileceği rapor edilmiştir (Berrang, vd., 2008; Bauman, vd., 2009; Bilek ve Turantaş, 2013). Ultrason tek başına uygulandığında çeşitli patojenler üzerindeki inaktivasyon etkisi 0.5-1.98 log kob/g arasında değişmektedir. Genellikle 300 W ve 600 W, 28 kHz, 10–30 dakika ultrason işlemi ile yaklaşık 1-3 log kob/mL düzeyinde *E. coli* ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu sağlanmıştır (Sarkinas, vd., 2018). Ispanak, marul, çilek, brokoli, şeftali, çeri domates, susam yaprağı, lahana vb. gibi sebze ve meyvelerde ultrason işlemi yaklaşık 1-6 log kob/mL veya gram düzeyinde inhibisyona neden olmuştur (Bott ve Bianging, 2004; Bilek ve Turantaş; 2013, Jose, vd., 2014; Bang, vd., 2017). Ultrasonun mikrobiyel inaktivasyon üzerindeki etkisi uygulama süresi, mikroorganizma türü, ultrason gücü ve meyve-sebze çeşidi vb.'den etkilenmektedir. Örneğin; Brimpa vd. (2013), marul ve çileğin farklı sürelerde (10, 20, 30, 45 ve 60 dakika) ultrason ile dekontaminasyonu sonucunda 2 log kob/mL'den ve 6.12 log kob/mL'ye kadar değişen seviyelerde bakteriyel (*E. coli*, *L. innocua*, *S. enteritidis* ve *S. aureus*) inhibisyon elde etmişlerdir.

Meyve sebzelerde organik asitlerin mikrobiyel inaktivasyonunda daha çok planktonik formlar üzerinde çalışılmakla birlikte biyofilmler üzerindeki etkilerine dair çalışmalar sınırlı bulunmuştur. Biyofilmler ile ilgili sınırlı çalışmalardan birinde marul ve lahanada ultrason muamelesinin (5 dakika) marulda 0.18 logaritmik birim düzeyinde lahanada ise 0.77 logaritmik birim düzeyinde *L. monocytogenes* biyofilm inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Srey, vd., 2014). Maruldaki biyofilm inaktivasyonu üzerinde rastlanan başka bir çalışmada ise ultrason ile yıkama işleminin 1.5 logaritmik birim *Salmonella* Typhimurium biyofilmini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Seymour, vd., 2002). Lahana ile ilgili bir çalışmada, kombine ultrason ve ozon muamelesi ile, lahananın renginin ve C vitamini içeriğinin korunduğu ve *E. coli* O157:H7 (3.93 log kob/g) ve *Salmonella* (3.84 log kob/g) inaktivasyonunun sağlandığı bildirilmiştir (Traore, vd., 2020). Takundwa vd. (2022), lahana üzerinde gelişen *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu için kekik, nisin ve ultrasonun kombine etkilerini incelemiş ve önemli düzeyde inaktivasyon elde etmişlerdir. Ayrıca, kombine muamelenin lahana renginde ve dokusunda önemli bir farklılığa sahip olmadığı, elektrolit sızıntısı üzerinde yalnızca minimum düzeyde etki yarattığı ve dolayısıyla diğer geleneksel yöntemlere göre çevre dostu bir alternatif olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

2.4 Ispanakta Mikrobiyel Kontaminasyon

Yeşil yapraklı sebzelerde, yaprak yüzeyi morfolojisi, besin maddesi miktarı ve bileşimi gibi faktörler mikrobiyel popülasyon üzerinde etkilidir. Bakteriler bitkilerde daha çok yaprak yapılarıyla ilişkili olan trikomlar, damarlar, stomalar ve epidermal hücre duvarları arasındaki bağlantı noktalarında bulunur. Kırmızı yapraklı hardal (*Brassica juncea*), Çin hardalı (*Brassica campestris*), hindiba (*Cichorium endivia*) ve ıspanak (*Spinacea oleracea*) dahil dört farklı sebze grubu karşılaştırıldığında ıspanağın en yüksek mikrobiyel popülasyona sahip olduğunu bildirilmiştir. Bitki çeşidi ve özellikle de yaprak ayasının morfolojik özellikleri mikrobiyel yük üzerinde etkilidir. Bitkilerin yüzey özellikleri yüzey hidrofobikliği, yüzey yapısal özellikleri ve yüzey topografyası ile tanımlanabilir. Yüzey hidrofobikliği, yüzey kimyasal bileşimi ve yüzey yapılarıyla ilgilidir ve yüzey hidrasyonunu etkiler. Yüzey yapısal özellikleri arasında, kütiküller genellikle kütikül mumu ile gömülüdür ve bu sadece bitki yüzeyi hidrasyonunu etkilemekle kalmaz, aynı zamanda bitki ile mikroorganizmalar arasındaki etkileşimi de değiştirir. Bitkilerdeki stomalar, mercimekler, kırık trikomlar ve kütikül ve yara izleri, mikroorganizmaların girişi için doğal yollar sağlayan kısımlardır (Mansvelt, vd., 1987; Babic, vd., 1996; Vacheethasanee, vd., 1998; Beattie, vd., 2002; Ruppel, vd., 2008; Mitra, vd., 2009; Lopez-Velasco, vd., 2011).

Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı *E. coli* ile ilgili salgınlarda yeşil yapraklı sebzelerin birinci sırada yer aldığı bildirilir. *E. coli* O157:H7 ile kontamine mini ıspanak tüketimine bağlı çeşitli salgınlar ve vakalar rapor edilmiştir (CDC, 2006). Örneğin; taze doğranmış ıspanak kaynaklı bir salgın ile 205 hasta ve 3 ölüm rapor edilmiş ve bu durum taze doğranmış ıspanak endüstrisinde önemli kayıplara yol açmıştır (Monterey, vd., 2007). Bu salgındaki kontaminasyon kaynağı hiçbir zaman açıkça tanımlanamamıştır. Taze ıspanağın kesin kontaminasyon kaynağının belirlenmesi genellikle zordur çünkü kontaminasyon tarladan sofraya sürecin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Taze yeşil yapraklı sebzelerin kontaminasyonunu kontrol etmek için halihazırda kullanılan risk yönetimi araçları, önlemeye dayanmaktadır ve çoğunlukla taze sebzelerin bilinen kaynaklardan biyolojik kontaminasyonunu önlemek ve azaltmak için kılavuzlar sağlayan iyi tarım uygulamaları ve iyi üretim uygulamalarına odaklanmaktadır.

Bakteriler kolonizasyon için öncelikli olarak yaprakları tercih eder ve genellikle yaprak dokusunda 6-8 log kob/g bakteri bulunur (Lindow ve Brandl, 2003). Yaprakta kolonize olan bakteriler kendilerini kuraklıktan, güneş ışığından, rüzgârdan ve diğer çevresel streslerden korumak için yüzey aktif maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri ve bol miktarda ekzopolisakkarit üretirler (Andrews ve Harris, 2000; Lindow ve Brandl, 2003; Morris ve Monier, 2003; Ramey, vd., 2004).

Ispanağın mikrobiyel kontaminasyonu çiftlik yönetiminden ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Spesifik olarak, ürünlerdeki mikrobiyel kontaminasyonun son sulamadan bu yana geçen zamandan, çalışanların kişisel hijyeninden ve ekimden önce tarlanın kullanımından güçlü bir şekilde etkilendiği görülmektedir (Park, vd., 2013). Ispanak gibi bazı sebzeler, gübrelenmiş topraktan, kanalizasyonla karıştırılmış su ile sulamadan veya kirlenmiş yüzey suyu sulamasından kontamine olabilir (Ingham, vd., 2004). Salata hazırlamak için kullanılan sebzelerin, insan atıklarıyla veya hayvan gübresiyle gübrelenen toprakta yetiştirilmesi olası mikrobiyel bulaşı yolu olarak görülür. *E. coli* O157 ayrıca salata hazırlığı sırasında ellerle de bulaşabilir (Medeiros, vd., 2001; Mnkeni, vd., 2006).

Pazara sunulan taze ıspanaklar elle toplanır, demetler halinde bağlanır ve tarlada kutulanır. İşlenmiş ıspanaklar makinelerle hasat edilir ve toplu olarak paketleme tesisine taşınır. Soğutma genellikle basınçlı hava altında sağlanır, ancak pasif depolamada sıcaklığın daha kademeli olarak azaltılması hala yaygındır. İşlenmesi amaçlanan tüm ürünler, işlenmeden önce bir süre saklanabilir. Hasat, bitki dokularında mekanik hasara yol açar ve homeostazı sürdürme, yaraları onarma ve fırsatçı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonu önleme girişimleriyle ilişkili fizyolojik değişikliklerin başlangıcını işaret eder (Delaquis, vd., 2007). Taze doğranmış yapraklı sebzelerin üretimi, kırpma, kesme ve yıkama dahil olmak üzere çeşitli işlemlerin uygulanmasını içerir. Dokuların bozulmasının ve ısıruk büyüklüğünde parçalara dönüşmesinin hem duyuşal hem de mikrobiyolojik kalitesini etkilediği bilinmektedir (Bolin, vd., 1977).

E. coli O157:H7 hidroponik (toprak kullanmadan su içinde mineral besin çözümleri kullanarak bitki yetiştirme yöntemi) olarak yetiştirilen ıspanak bitkilerinin kök sistemi yoluyla bitkiye nüfuz eder ve gövde ve hatta yaprak seviyesine kadar dağılılabılır. Hidroponik olarak yetiştirilen ıspanaklarda *E. coli* internalizasyonunun yani hücreye

girişinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bitkilerde *E. coli*'nin internalizasyonu (hücreye girişi) tarla koşullarında nadirdir ancak kompost gübre ve sulama koşulları internalizasyonu arttırabilir. Hidroponik olarak yetiştirilen ıspanakta kök sisteminin yaralanması, *E. coli* O157:H7'nin internalizasyonunu destekler ve böylece bu bakterinin bitkinin yenilebilir kısımlarına taşınması olasılığını arttırır (Macarisin, vd., 2014). *E. coli* varlığı genellikle köklerde, ıspanak yapraklarının yenilebilir kısmının *E. coli* barındırma olasılığı düşüktür. Ancak hasat sırasında kökteki *E. coli*'nin iç yaprağa geçmesi de mümkündür. Bu olasılık, güvenli, minimum düzeyde işlenmiş salata sebzelerinin üretimi için bir kritik kontrol noktalarında tehlike analizi şemasının geliştirilmesi gerekli kılabilir (Warriner, vd., 2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Patojen Bakteri ve Organik Asit Çözeltisi Ön Hazırlığı

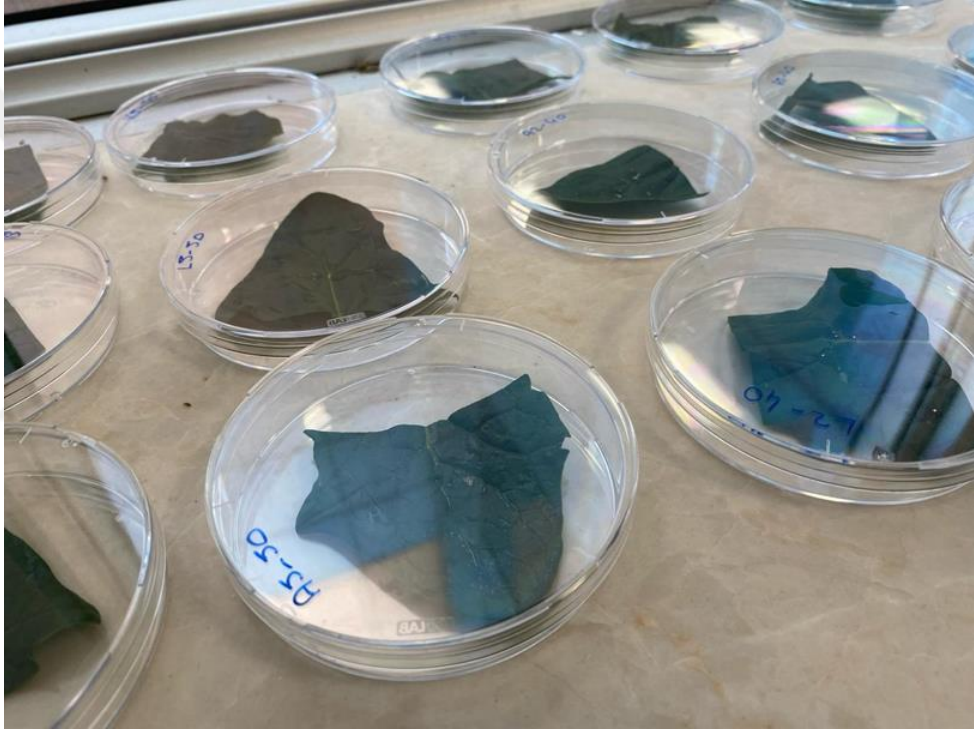
Gıda patojeni olarak kullanılan *Escherichia coli* (NCTC 12241) Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Gıda Teknolojisi Bölümü stok kültüründen temin edilmiştir. -20°C'deki %20 gliserol (Sigma-aldrich, Germany) katkılı Brain Heart Infusion broth (BHI-Oxoid, United Kingdom) içindeki stok çözeltilerde bulunan patojen bakterilerin her birinden bir öze dolusu alınıp Tryptic Soy Agar (TSA; Difco) üzerine tek koloni düşecek şekilde çizgi ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından TSA'da gelişen kültürlerden tek bir koloni alınmış ve 10 mL Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) içerisine inoküle edilerek 37°C'de 18 saat (overnight culture) inkübasyona bırakılmıştır. Böylece inkübasyondan sonra deneylerde kullanılmak üzere sürekli sabit konsantrasyonda (yaklaşık 8 log kob/mL) bakteriyel hücre elde edilmesi mümkün olmuştur (Avila, vd., 2018; Melcon, vd., 2019). Her bir deneyde bu işlemler tekrar edilmiştir.

İnaktivasyon denemelerinde kullanılan laktik asit ve asetik asit çözeltileri inaktivasyon deneyinin yapılacağı aynı gün taze olarak hazırlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda (Park ve Chen, 2015; Amrutha, vd., 2017) %2'nin üzerindeki konsantrasyonlarda inaktivasyon etkisi açısından önemli bir fark görülmediği bildirildiği için bu çalışmada organik asit konsantrasyonu olarak %2 seçilmiştir. Asetik asit (Merck) ve Laktik asit (Merck) çözeltileri %2 konsantrasyonda olacak şekilde saf su ile karıştırılmış ve

hazırlanan çözeltilerin kapağı sıkıca kapatılarak oda sıcaklığında aynı gün kullanılmak üzere bekletilmiştir.

3.2 Ispanak Örnekleri Ön Hazırlığı

Ispanak örnekleri analizlerin yapılacağı gün taze olarak tedarik edilmiş ve aynı gün analizlerde kullanılmaya kadar 4°C’de depolanmıştır. Ispanaklar öncelikle doğal mikrofloralarından ve yanı sıra olası kontaminasyondan arındırmak için steril su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra yapraklar kurulanmış ve yaklaşık 25 cm² olacak şekilde steril makas yardımı ile kesilip ve ultraviyole ışık altında her bir yüzü 5 dakika olmak üzere toplam 10 dakika bekletilerek dekontamine edilmiştir (Cui, vd., 2016).



Şekil 3.1. Biyofilm oluşum denemesi için hazırlanmış ıspanak yaprakları

3.3 Ispanak Örneklerinde Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşturmak için *E. coli* nokta inokülasyon yöntemi ile ıspanak örneklerine bulaştırılmıştır. Böylece nokta inokülasyon ile ıspanak örneklerine bilinen sayıda bakteriyel hücre bulaşısı sağlanmıştır. Ispanakların pürüzsüz üst yüzeyine 100 µL hücre inoküle edilmiş (yaklaşık 7 log kob) ve steril petri kutularının içine koyularak 24 saat oda sıcaklığında (yaklaşık 20°C’de) tutulmuştur. Biyofilm oluşumunun

ardından her bir ıspanak parçası 50 mL saf su içerisine daldırılarak yıkanmış, böylece ıspanağa tutunmayan veya az tutunan hücreler uzaklaştırılmıştır (Srey, vd., 2014).

3.4 Ispanak Örneklerinin Farklı İnaktivasyon Çözeltileri ve Sonikasyon Koşulları ile Dekontaminasyonu

Ispanak yaprakları %2 organik asit (laktik asit veya asetik asit) ve kontrol örneği olarak ise PBS içeren 30 mL'lik çözelti içerisine daldırılmış (500 mL'lik cam beher içinde) ve/veya bu çözelti 28 L saf su bulunan ultrason banyo (ISOLAB; Ultrasonik güç: 360 W, frekans: 40 kHz; Isıtma gücü: 600 W) içine koyulup %100 güç seviyesinde 2 ve 5 dakika boyunca 20, 40 ve 50°C'de bekletilmiştir. İnaktivasyon muamelelerinden sonra her bir örnek steril su ile durulanmış ve ardından canlı hücre sayımı (bknz. 3.5) ile ilgili analiz yapılmıştır (Huang ve Chen, 2011; Srey vd., 2014; Cui vd., 2016 Bang vd., 2017). İnaktivasyon denemesinde pozitif kontrol olarak PBS kullanılmıştır. İnaktivasyon deneme planı Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Ispanakta gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu bağımsız değişkenleri

İnaktivasyon çözeltisi	Sonikasyon süresi	Sonikasyon sıcaklığı
%2 Laktik asit	2 dakika	20°C
%2 Asetik asit	5 dakika	40°C
Kontrol (PBS)		50°C

*: 3 farklı inaktivasyon çözeltisi x 2 farklı süre x 3 farklı sıcaklık x 1 patojen bakteri=18 farklı inaktivasyon denemesi; 3 tekerrür 2 paralel deneme ile 18x3x2=108 adet inaktivasyon denemesi

3.5 Ispanakta Gelişen *E. coli* Biyofilmlerindeki Canlı Hücre Sayısını Belirleme

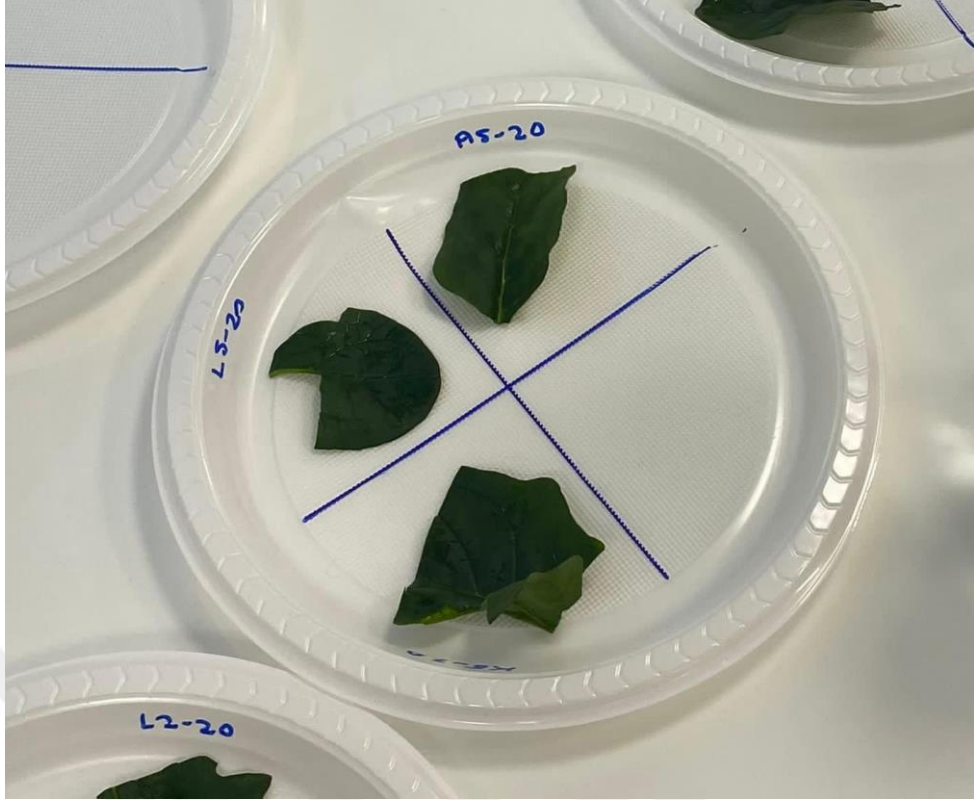
İnaktivasyon muamelesinden sonra ıspanak örneklerinde bulunan patojen bakterilerin sayımı için her bir ıspanak parçası 9 mL dilüsyon sıvısında (%0.1 pepton-water; Oxoid-UK) Stomacher - Bagmixer interscience cihazı kullanılarak homojenize edilip seyreltilmiştir. TSA besiyerine yayma kültürel ekim yöntemi ile ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra canlı hücre sayısı log kob/cm² cinsinden verilmiştir (Nieemira ve Cooke, 2010).



Şekil 3.2. Ispanak yapraklarının farklı çözeltiler ve sonikasyon ile dekontaminasyonu

3.6 Ispanak Örneklerinin Duyusal Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Ispanak örneklerinin duyusal kalite özelliklerini belirlemek için 9 puanlık hedonik skala üzerinden panelistlere “-koku, -renk, -tat, -tekstür, -sululuk (körpelik) ve -genel izlenim” gibi özelliklere göre puan vermeleri istenmiştir. Ispanak örneklerinde inaktivasyon muamelelerinden sonra duyusal özelliklerin en az 5 puan olması kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir (Bari, vd., 2005; Jahid, vd., 2015; Cui, vd., 2016).



Şekil 3.3 Farklı çözeltiler ve ultrasound koşulları ile dekontaminasyondan sonra ıspanakların duyu analizi

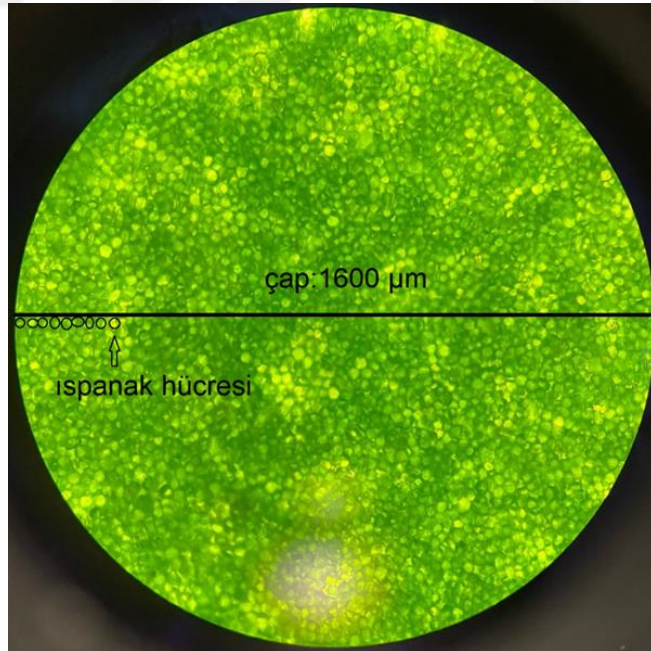
3.7 Ispanak Örneklerinin Mikroskopik Görüntüsü

İnaktivasyon koşullarının ıspanak yaprağının rengi ve hücre yapısı üzerindeki etkisini daha iyi gözlemleyebilmek için mikroskopik gözleme başvurulmuştur. Bunun için, ıspanak yapraklarının mikroyapısı Olympus CX23 marka basit ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Farklı inaktivasyon koşullarına maruz bırakılan her bir ıspanak yaprağı kare şeklinde kesilerek lam üzerine yerleştirilmiş ve basit ışık mikroskobunun 10'luk objektifi ile incelenmiştir. Işık mikroskobunda elde edilen görüntü ile ıspanak yapraklarının rengi, hücre yapısı ve boyutu karşılaştırılmıştır. Ispanak hücre boyutunun hesaplanmasında aşağıdaki denklem (3.1) kullanılmıştır (Ariffin ve ark., 2017; Ankara Üniv. açık ders notları).

$$\text{Hücrenin uzunluğu} = \text{Görüntüleme alanının çapı} / \text{Tahmini hücre sayısı} \quad (3.1)$$



Şekil 3.4. Ispanak yaprağında mikroskobik gözlem



Şekil 3.5. Ispanak hücresi mikroskobik görüntüsü

3.8 İstatistiksel Analiz

Bütün analizler 3 tekerrür ve 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar ortalama olarak verilmiş ve SPSS Versiyon 20.0 (SPSS Inc., USA) istatistik paketiyle değerlendirilmiştir. Örnek grupları arasındaki farklar varyans analiziyle (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testiyle) %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalarda ise T-testi kullanılmıştır (Erol, 2010; Can, 2019).

Ayrıca “çoklu doğrusal regresyon analizi” ile bağımsız değişkenlerin biyofilm inaktivasyon oranı (%) ile ilişkisi modellenmiştir (Erol, 2010; Can, 2019).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerine farklı koşullardaki sonikasyonun etkisi inaktivasyon işlemlerinden sonra ıspanak yüzeyinde kalan biyofilmlerdeki canlı hücre sayımı ile belirlenmiştir. Farklı sonikasyon koşullarının etkisini karşılaştırmak için hem ıspanak yüzeyindeki *E. coli* biyofilmlerindeki canlı hücre sayısındaki azalış ve hem de yüzde biyofilm inaktivasyonu sonuçları değerlendirilmiştir. *E. coli* biyofilmlerinin uygulanan inaktivasyon işlemlerinin bir sonucu olarak ıspanak yüzeyinde tutunması zayıflar ve yıkama işlemi ile biyofilmlerin bir kısmı veya tamamı uygulanan işleminin etkinliğine göre ortadan kaldırılır. Ispanak yüzeyindeki biyofilmlerin bir kısmının veya tamamının ortadan kaldırılması sonucu canlı hücre sayılarında düşüş beklenir. Daha önceki çalışmalarda inaktivasyon etkisi açısından sonuçlar hem canlı hücre sayısındaki azalış hem de yüzde inaktivasyon oranı üzerinden verildiği için bu çalışmada elde edilen veriler de hem canlı hücre sayısındaki azalış hem de yüzde inaktivasyon oranı cinsinden hesaplanmıştır.

Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere, inaktivasyon işlemlerinin duyuşal kalite özelliklerine zarar vermemesi ve böylece tüketici tarafından kabul edilebilir olması gerekir (Parish, vd., 2003; Ssemenda, vd., 2018). Ayrıca yapraklı sebzelerde inaktivasyon işlemlerinin yaprak hücreleri üzerinde de kusur bırakmaması istenir (Ariffin, vd., 2017). *E. coli* biyofilmlerinin inaktivasyonu sırasında ıspanaktaki duyuşal ve morfolojik özellikler üzerinde olumsuz etki bırakmaması gerektiği için bu çalışmada ıspanak örnekleri duyuşal ve mikroskopik gözlemlerle de değerlendirilmiştir.

4.1 Ispanak Yüzeyinde *E. coli* Biyofilm Gelişimi

Patojen bakteriler yüzey alanı geniş olan yapraklı sebzelerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler (Lindow ve Brandl, 2003). Ispanak özellikle köklerinde patojen bakteri barındırma ve böylece bitkide biyofilm oluşturma potansiyeline sahip bir sebzedir (Macarisin, vd., 2014). Bitkilerde biyofilm oluşumunun pozitif olarak değerlendirilebilmesi için en az 1 logaritmik birim canlı hücre bulunması gerekir (Carter ve Brandl, 2015).

Çizelge 4.1'de ıspanak yüzeyindeki mikroorganizma yükü gösterilmiştir. Bu çalışmada *E. coli* inokülasyonu yapılan ıspanaklarda yaklaşık 8 log kob/cm² canlı hücre saptanırken, inokülasyon uygulanmayan kontrol örneklerinde canlı hücre sayısı <1 log kob/cm² olarak bulunmuştur. *E. coli* inokülasyonu yapılan örneklerdeki canlı hücre sayısının 1 log kob/cm²'den büyük olması biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiş ve inaktivasyon deneylerinde biyofilm pozitif olduğu doğrulanan bu ıspanaklar kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Bitki yüzeyine tutunma ve böylece biyofilm oluşturma yeteneği türler arasında farklılık gösterir ve büyüme koşullarına ve hücrelerin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilir. *E. coli* O157:H7'nin marul, ıspanak, elma, filizler ve kavun dahil olmak üzere çeşitli meyve ve sebzelerin yüzeylerine tutunduğu bildirilmiştir (Boyer, vd., 2007; Uhlich, vd., 2008). Bitkisel ürünlerdeki *E. coli* kolonizasyonu bitki çeşidine ve sulama yöntemine göre değişebilir. Özellikle de ıspanak ve marul gibi sebzelerin yaprak yapısı ve topografisi *E. coli* kolonizasyon oranı üzerinde belirleyici bir faktördür (Markland, vd., 2012). Ispanak yaprağındaki kıvrımlı lifler ve hücre dışı matrisin bir bileşeni olan selüloz gibi hücresel uzantılar *E. coli*'nin tutunma veya kolonize olma kapasitesinde etkilidir. Ancak kıvrımlı liflerin biyofilm oluşumunda ve stabilitesinde selüloza göre daha etkin rol oynadığı bildirilmiştir (Macarisin, vd., 2012). Morris vd. (1997) ise, geniş yapraklı hindiba, ıspanak, marul, Çin lahanası, kereviz, pırasa, fesleğen ve maydanoz gibi farklı bitkisel ürünlerin yapraklarında doğal olarak oluşan biyofilmleri gözlemlemiş ve biyofilmlerin filosferde her yerde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Hasat sonrası bitki patojenleri tarafından bozulma potansiyeli ve pazara girmeden önce gıda kaynaklı patojenlerle kontaminasyon potansiyeli nedeniyle, taze sebze ve

meyvelerdeki hasat sonrası işleme ve depolamanın mikrobiyal topluluk kompozisyonu üzerindeki etkisine büyük ilgi vardır. Örneğin, işlendikten sonra numunesi alınan marulun, çiftlikte numunesi alınan maruldan daha az çeşitliliğe sahip bakteri topluluklarına sahip olduğu rapor edilmiştir (Handschr, vd., 2005). Paketleme ve düşük sıcaklıkta saklama sonrasında ıspanak yapraklarındaki bakteri bileşiminde bir değişiklik olduğu bildirilmiştir (Lopez-Velasco, vd., 2010).

Roth, vd. (2018) 2016 ile 2017 yılları arasında Florida'daki çiftliklerde yerel üreticiler tarafından üretilen yapraklı yeşillikler, ıspanak ve domateste süpermarkette satılan ürünlere kıyasla *E. coli* dahil daha yüksek koliform varlığı tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.1. Ispanak yüzeyindeki mikroorganizma yükü

	Canlı Hücre Sayısı (log kob/cm ²)	Biyofilm Oluşumu
<i>E. coli</i> biyofilmi	8.65 ± 0.25	+
Kontrol	<1.00	-

4.2 Farklı İnaktivasyon Çözümleri ve Sonikasyon Koşullarının Ispanak Yüzeyinde Gelişen *E. coli* Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Yeşil yapraklı sebzeler ve doğranmış paketlenmiş salata üreticileri başta olmak birçok ticari işletme özellikle de hasat sonrası işleme koşulları nedeniyle kirlenen ürünleri fiziksel uzaklaştırma ve çeşitli dezenfeksiyonları birleştiren üçlü yıkama işlemleriyle temizler. Ancak planktonik hücreler nispeten düşük seviyedeki yıkama suyu dezenfektanı ile kolayca kontrol edilirken, yapraklı ürünlerin yüzeyinde kolonize olan biyofilmlerin dekontaminasyonu zordur (Annous, vd., 2009). Hipoklorit veya diğer sanitasyon ajanlarıyla geleneksel yıkama yöntemlerinin yalnızca sınırlı patojen inhibisyonu (1-2 logaritmik birim) sağlayabildiği ve bu nedenle *E. coli* O157 gibi birçok enterik patojenin varlığı nedeniyle mikrobiyolojik güvenliği garanti edemediği iyi bilinmektedir. *E. coli* O157'nin çok düşük dozlarının bile hastalığa neden olabildiği düşünüldüğünde gıda güvenliği için ciddi bir risktir (Sapers, 2005; USFDA, 2001a). Ayrıca patojenler genellikle antimikrobiallere maruz kalmaya karşı korunur çünkü bunlar meyve ve sebzelerin yüzey altı alanlarında, örneğin yaprakların iç boşluklarında bulunur (Fatemi ve Knabel, 2006). Biyofilmlerdeki ve ürünlerin yüzey altı alanlarındaki patojenlere ulaşım bunları etkisiz hale getirmek için yıkama işleminin

sonikasyon ile desteklenmesi önemlidir. Nitekim bu çalışmada etkili bir dekontaminasyon için organik asit ve sonikasyon işlemine başvurulmuştur.

Ispanaktaki *E. coli* biyofilmlerinin farklı sıcaklık ve sürelerde farklı çözeltilerle sonikasyon işlemine maruz bırakılmaları sonucu canlı hücre sayılarında gözlemlenen düşüş Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Sonikasyon uygulama süresinin ve sıcaklığın artışı ile birlikte *E. coli* biyofilm inaktivasyonu da artmıştır. En düşük *E. coli* biyofilm inaktivasyonu ($1.02 \log \text{ kob/cm}^2$) 20°C’de 2 dakika organik asit içermeyen çözelti (PBS) ile sonikasyon muamelesi sonucunda elde edilirken, en yüksek *E. coli* biyofilm inaktivasyonu ($6.03 \log \text{ kob/cm}^2$) 50°C’de 5 dakika laktik asit çözeltisi ile sonikasyon muamelesi sonucunda elde edilmiştir. Sonuçlarımızı destekler nitelikte, Huang ve Chen (2011), ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* O157:H7 inaktivasyonunda hafif ısı ile birlikte organik asitlere maruz bırakmanın oldukça etkili olduğunu bulmuşlardır. İlgili çalışmada ıspanakların 40°C’de 5 dakika boyunca %1 laktik asit’e maruz bırakılmaları ile $2.7 \log \text{ kob/g}$ düzeyinde *E. coli* O157:H7 inhibisyonu sağlanmıştır.

E. coli biyofilm sayısındaki azalış bakımından organik asit çözeltisi kullanımı PBS çözeltisine göre istatistiksel olarak daha etkili bulunmuştur ($p < 0.05$). Laktik asit çözeltisi muamelesi ile asetik asit çözeltisi muamelesi arasında ise 50°C’de 2 dk. sonikasyon işlemi hariç istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). *E. coli* biyofilm inaktivasyonunda canlı hücre sayısındaki azalış bakımından sıcaklık ve sürenin etkisi de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). PBS ile muamele edilen örneklerde 50°C-2 dakika ile 20°C-5 dakika sonikasyon işlemleri arasında antibiyofilm etkileri bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Laktik asit ile muamele edilen örneklerde 40°C-2 dakika sonikasyon ile elde edilen azalış ile 20°C-5 dakika ve 40°C-5 dakika sonikasyon ile elde edilen azalış bakımında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Asetik asit ile muamele edilen örneklerde 20°C-5 dakika sonikasyon ile elde edilen azalış ile 20 °C – 2 dakika ve 40 °C – 5 dakika sonikasyon işlemi ile elde edilen azalış arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Organik asitler, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından GRAS yani “kullanımı genellikle güvenli olarak kabul edilen” antimikrobiyel maddeler kategorisinde gösterilmiştir. Organik asitler, çeşitli çalışmalarda *E. coli*, *Salmonella* sp. ve *Listeria monocytogenes* gibi önemli gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel

aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrışmamış (Dissosiye olmayan) organik asit molekülleri mikrobiyel hücre zarına serbestçe nüfuz eder ve hücre içinde ayrışarak hücre içi pH'ı düşürür ve böylece mikroorganizmaları inaktive eder (Beck-Friis, vd., 2003; Sundberg ve Jonsson, 2005; Lieleg, vd., 2011). Örneğin, malik asidin havuç ve diğer gıdayla temas eden yüzeylerde *S. enterica* serovar Typhimurium biyofilminin inhibisyonunda etkili olduğu bulunmuştur (Over vd., 2009; Singla ve Ganguli, 2014). Asetik asitin (%0.5 ve %1) ise *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmlerini inhibe edici etkilerinden bahsedilmiştir (Bjarnsholt, vd., 2014). Laktik asitin de taze ıspanakta *E. coli* O157:H7 inaktivasyonunda etkili oldu bildirilmiştir (Huang, vd., 2012).

Taze meyve ve sebzelerde özellikle de bakterilerin daha dirençli formları olan biyofilm inaktivasyonunda ultrasonikasyona başvurulur. Bai vd. (2023) farklı güçte (300, 200 ve 100 W, 5 dakika) ve özellikle de düşük frekansta sonikasyon muamelesi ile ıspanakta *E. coli* O157:H7 biyofilm inaktivasyonunu başarmışlardır. 300, 200 ve 100 W güçte sırasıyla %24.14, %16.70 ve %12.91 oranında biyofilm inaktivasyonu elde etmişlerdir.

Cossu, vd. (2016), kombine bir UV-A ve gallik asit'in, hem yüksek hem de orta düzeyde organik içerik varlığında *E. coli* O157:H7 üzerinde önemli bir antimikrobiyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. UV ışınlarla aktifleştirilen gallik asit uygulaması ile yaklaşık canlı hücre yükünde 4 log kob/mL düzeyinde düşüş elde etmişlerdir.

Huang, vd. (2012), *E. coli* O157:H7 ile aşılanan taze ıspanakların buzdolabındaki depolanma koşullarının etkisini değerlendirmişlerdir. Laktik asit'in, buzdolabında saklama sırasında yıkama ve dezenfeksiyon adımıında kullanılan alil izotiyosiyanatın antimikrobiyel etkinliğini arttırdığını bulmuşlardır. Ganesh vd. (2010), ıspanak yapraklarına tek başına ve üzüm çekirdeği ekstraktı ile kombinasyon halinde organik asitlerin elektrostatik spreylemesini uygulamış ve bakterisidal etki saptamıştır.

Chhetria, vd. (2019), laktik asit ve asetik asit ile muamele ettikleri ıspanakları buzdolabı koşullarında depolamışlar ve *E. coli* biyofilm yükündeki azalışı incelemişlerdir. İlgili  alışmada *E. coli* biyofilmlerine karşı asetik asitin hiçbir etki göstermediği ancak laktik asit'in depolamanın 24. saatinde yaklaşık 4 log kob/cm² biyofilm inhibisyonunu sağladığı bulunmuştur.

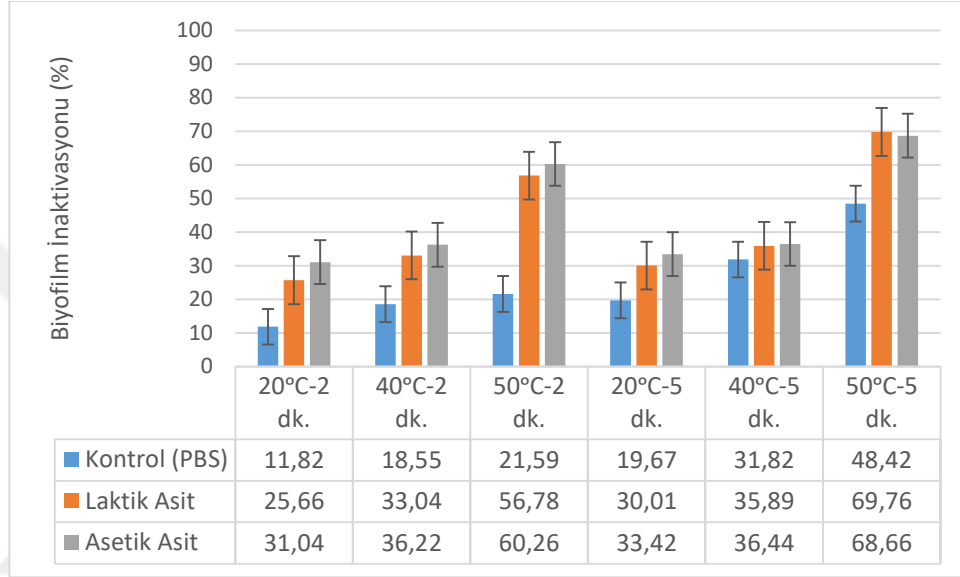
Çizelge 4.2. Farklı koşullarda sonikasyona maruz bırakılan ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* biyofilm sayısındaki azalış (log kob/cm²)

Sonikasyon işlem koşulları	Kontrol (PBS)	Laktik asit (%2)	Asetik asit (%2)
20 °C – 2 dakika	1.02±0.04 ^{eB}	2.22±0.12 ^{eA}	2.68±0.16 ^{dA}
40 °C – 2 dakika	1.61±0.06 ^{dB}	2.86±0.16 ^{cdA}	3.13±0.12 ^{cA}
50 °C – 2 dakika	1.87±0.07 ^{cC}	4.91±0.06 ^{bB}	5.21±0.06 ^{bA}
20 °C – 5 dakika	1.70±0.04 ^{cB}	2.60±0.11 ^{dA}	2.89±0.12 ^{dcA}
40 °C – 5 dakika	2.75±0.01 ^{bB}	3.10±0.03 ^{cA}	3.15±0.03 ^{cA}
50 °C – 5 dakika	4.19±0.17 ^{aB}	6.03±0.12 ^{aA}	5.94±0.10 ^{aA}

A-C: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). a-c : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

İnaktivasyon koşullarının biyofilm yükünün tamamını mı yoksa bir kısmını mı inaktive ettiği ile ilgili bilgi vermesi açısından sonuçlar yüzde olarak da hesaplanmıştır. Ispanak yüzeyinde geliştirilen *E. coli* biyofilmlerinin farklı sıcaklık ve sürelerde farklı çözeltilere maruz bırakılmaları sonucu elde edilen % biyofilm inaktivasyon oranı Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere bu çalışmada kullanılan tüm inaktivasyon koşullarında biyofilm yükünün tamamı (%100) inaktive edilememiştir. En yüksek yüzde biyofilm inaktivasyonu (%69.76) 50°C’de 5 dakika laktik asit muamelesi ile elde edilmiştir. Ayrıca 50°C’de 2 dakika sonikasyon muamelesi hariç diğer bütün sonikasyon muamelelerinde laktik asit ve asetik asitin inaktivasyon etkileri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu durum taze meyve ve sebzelerin dekontaminasyonunda her iki asite de başvurulabileceğini göstermiştir. Nitekim literatürde *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerine asit türünün etkisinin az olduğu ile ilgili veriler mevcuttur (Stopforth, vd., 2003). Ancak bu bilgilerin aksine *E. coli*’nin malik asit ve sitrik asit gibi asitlere kıyasla asetik asite daha hassas olduğunu bildiren çalışmalarda mevcuttur (Abadias, vd., 2012). Ancak asitlerin kıvam, koku, maliyet vb. özellikleri açısından daha üstün olanları amaca göre tercih edilebilir. Asetik asit ve laktik asitin antibakteriyel etki mekanizması ortam pH’sını düşürmeleriyle ilgilidir. Bu organik asitlerin pH’yı düşürme yetenekleri de dissosiyeye ve dissosiyeye olmayan formları ile ilişkilendirilmiştir. Dissosiyeye olmamış olan ve yüksüz formdaki organik asitler antibakteriyel etkiden birinci derecede sorumlu tutulmuştur. Dissosiyeye olmayan bu moleküller lipofiliktir ve bu özellikleri ile

hedef mikroorganizmaların lipid yapısındaki membranını kolayca geçerek sitoplazmalarına girebilirler ve böylece hücre ölümüne neden olurlar (Braiek, vd., 2021). Organik asitlerin dissosiasyonunda sıcaklık ve sonikasyon işlemi süresi etkili faktörlerdendir, sıcaklık yükseldikçe ve sonikasyon süresi uzadıkça dissosiasyon artabilir (Saeeuddin ve Khanzada, 2004; Fındık, vd., 2006). Nitekim bu çalışmada en fazla 50°C ve 5 dakika sonikasyon işlemine başvurulmuş ve daha yüksek sıcaklık ve sürede inaktivasyon işlemine dissosiasyonu tetiklememesi için başvurulmamıştır.



Şekil 4.1 Farklı sonikasyon koşullarında *E. coli* biyofilmi inaktivasyon oranı

4.3 *E. coli* Biyofilm İnaktivasyonunun Regresyon Analizi ile Modellenmesi

Gıda endüstrisinde süreç optimizasyonunda ve risk değerlendirmesinde matematiksel modellere başvurulur. Gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonunun matematiksel modellerle kesin bir doğrulukla tahmin edilmesi mümkün değildir, ancak bu modeller bir olasılık sunar. Gıda güvenliğini sağlamaya yönelik olarak inaktivasyon ile ilgili sonuçların matematiksel modellerle açıklanması hem gıda endüstrisi hem de araştırmacılar için oldukça kıymetlidir (Vidacs, vd., 2018; Sheen, vd., 2018). Çalışmamızda da çoklu doğrusal regresyon analizleri ile yüzde biyofilm inaktivasyonu açısından tahmin modelleri geliştirilmiştir.

E. coli biyofilmi oluşturulan ıspanakların dekontaminasyon işleminden sonra canlı hücre sayılarındaki azalışa göre hesaplanan yüzde biyofilm inaktivasyonu sonuçları çoklu doğrusal regresyon analizine göre modellenmiştir. Çoklu doğrusal regresyon analizinde 3 bağımsız değişken (X_1 =sıcaklık, X_2 =süre ve X_3 =çözelti) ve 1 bağımlı

değişken (Y=hücre sayısındaki azalış veya optik yoğunluk) için klasik yöntemle başvurulmuş ve aşağıdaki regresyon denklem modeli kullanılmıştır (4.1). Elde edilen bu regresyon modeli farklı koşullardaki sonikasyon işleminin ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerindeki etkisinin tahminlenmesini mümkün kılmıştır.

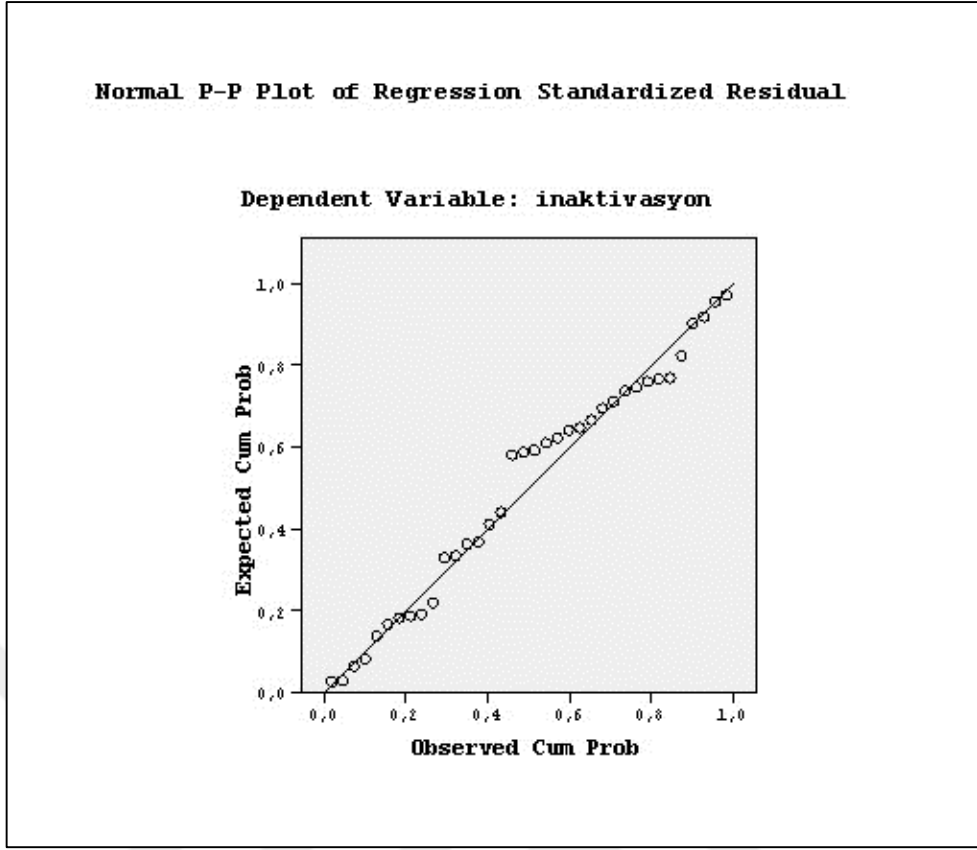
$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \varepsilon \quad (4.1)$$

ıspanak yüzeyinde gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu (%) üzerinde etkisi olduğu düşünülen sıcaklık (X_1), süre (X_2) ve çözelti (X_3) gibi bağımsız değişkenlerin biyofilm inaktivasyon oranını açıklamaya yönelik olarak yapılan çoklu doğrusal regresyon analizi sonucunda sıcaklık, süre ve çözelti değişkenleri birlikte, biyofilm inaktivasyon oranı ile anlamlı bir ilişki ($R:0.852$ $R^2:0.726$) sergilemişlerdir. Sıcaklık, süre ve çözelti gibi bağımsız değişkenler birlikte inaktivasyon oranındaki değişimin %72'sini açıklamaktadır. Standartlaştırılmış regresyon katsayılarına göre, bağımsız değişkenlerin inaktivasyon oranı üzerindeki görece önem sırası, sıcaklık ($\beta=0.660$), çözelti ($\beta=0.469$) ve süredir ($\beta=0.266$). Regresyon katsayılarının anlamlılık testleri göz önüne alındığında, bağımsız değişkenlerin hepsinin (sıcaklık, süre ve çözelti) inaktivasyon oranı üzerinde önemli etkisinin ($p<0.01$) olduğu görülmüştür. ıspanak yüzeyinde gelişen biyofilm inaktivasyon oranını açıklayan regresyon denklem modeli (4.2) aşağıda verilmiştir.

$$Y = -24.233 + 0.876X_1 + 2.931X_2 + 9.513X_3 \quad (4.2)$$

Son zamanlarda 40-50°C'de hafif ısıya maruz bırakmanın marul ve ıspanakta kahverengileşmeyi azalttığı ve kalitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Delaquis vd., 1999; Murata vd., 2004; Gomez vd, 2008; Roura vd., 2008). Hafif ısı, dezenfektanların antimikrobiyel etkisini artırabilir. Sıcak klorlu suyun (3 dakika boyunca 47°C) maruldaki *E. coli* O157:H7 miktarını 2 logaritmik birimden fazla azalttığı rapor edilmiştir (Delaquis, vd., 2002). Isıl işlem aynı zamanda ıspanağın hasat sonrası raf ömrünü uzatmak için de kullanılabilir (Gomez, vd., 2008). Çalışma sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere inaktivasyon üzerinde en etkili faktör sıcaklıktır. Nitekim çalışma sonuçlarımızı destekler nitelikte, Liv vd. (2001), *Escherichia coli* O157:H7 inoküle edilmiş olan marul yapraklarının hafif ısıtılmış su ile yıkanması ile daha etkili bir inaktivasyon (2- 2.5 log kob/g azalış) sağlandığını bildirmişlerdir.

Çoklu doğrusal regresyon analizlerinde model fonksiyonunun açıklayamadığı değişkenlik için “artık değerler” de incelenmektedir. Artık değer, bağımlı değişkenin gözlenen değeri ile tahmin edilen değeri arasındaki sapmalar için kullanılır. Artık değerlerin normalliğini belirlemek için normal P-P grafiğine başvurulmuştur. Normal P-P grafiğinde gözlenen olasılık değerlerine karşı beklenen olasılık değerlerinin grafiğindeki basamaklı ve kesintili yapı verideki heterojenliği ya da karma yapıyı belirtmektedir. Grafikteki veriler diyagonal çizgiye ne kadar yakınsa, artık değerler o kadar normal dağılıma yakındır. Bir başka ifadeyle P-P grafiği, verilerin normal dağılıma ne kadar uyduğunu görmek için kullanılır. Eğer veriler normal dağılıma uyuyorsa, grafik çizgiyi mükemmel şekilde takip eder. Ancak, eğer veriler normal dağılıma uymuyorsa, çizgi düzensiz bir şekilde dalgalanacaktır. Bu, verilerin normal dağılımdan ne kadar sapma gösterdiğini açıklar (Erol, 2010). Bu çalışmada gözlenen ve tahmin edilen biyofilm inaktivasyonuna ait grafik aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.2). Gözlenen ve tahmin edilen biyofilm inaktivasyonu ile ilgili grafik incelendiğinde elde edilen doğrusal çizginin altındaki ve üstündeki noktaların değişkenin birim değerlerinin kuramsal dağılımından (normal) önemli düzeyde sapma göstermediği açık biçimde görülmektedir. Bu çalışmada grafikte aşırı sapmanın olmaması dağılımın normal olma durumunu ve düzeyini şekilsel olarak da göstermiştir. Nitekim, biyofilm inaktivasyonu normal dağılan nicel verilerin karşılaştırılmasında zaten daha önceki bölümlerde varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Ancak aşağıdaki grafiğe gözlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişki ve normal olma düzeyi hakkında bilgi vermesi açısından yer verilmiştir.



Şekil 4.2 Gözlenen ve tahmin edilen biyofilm inaktivasyonu grafiği

4.4 Farklı İnaktivasyon Çözeltileri ve Sonikasyon Koşullarının İspanağın Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi

Mikrobiyel inaktivasyon yönteminin tercihinde duyusal özelliklerin korunması veya kabul edilebilir düzeylerde tutulması elzemdir. Bu yüzden birden fazla inaktivasyon yönteminin birlikte kullanıldığı kombine yöntemlere başvurulur (Parish, vd., 2003). Kombine inaktivasyon yöntemleri ile dekontaminasyon açısından sinerjik etki yaratılır ve böylece duyusal kabul edilebilirlik sağlanır (Zhang, vd., 2022; Addo, vd., 2023).

Farklı sonikasyon işlemlerine maruz bırakılan ıspanak örneklerinin duyusal özellikleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere ıspanakta inaktivasyon işleminin uygulanabilir olması ile ilgili duyusal özellik kriteri olan en az 5 puan şartı bir örnek hariç (50°C, 5 dakika asetik asit muamelesi) hepsinde sağlanmıştır. Duyusal özellikler açısından en düşük puanlar genellikle asetik asit muamelesine maruz bırakılan örneklerde görülmüştür. Nitekim literatürde asetik asitin ekşi ve keskin kokusu olduğu, laktik asitin ise hafif asit tatta, kokusuz ve daha viskoz bir sıvı olduğu belirtilmiştir. Bu durum çalışmamızda duyusal özellikler açısından

asetik asitin daha düşük puanlar almasını açıklamıştır (Braiek, vd., 2021). 50°'de 5 dakika sonikasyon koşullarında asetik asit ile muamele sonucu ıspanak örnekleri kritik duyuşal kabul edilebilirlik sınır değeri olan 5 puanın altında puan almıştır. Ancak diğer örneklerde 5 puan ve üzerinde puanlar alındığı için ilgili inaktivasyon yöntemlerinin duyuşal kabul edilebilirlik açısından uygulanabileceği ortaya çıkarılmıştır. Nitekim sonuçlarımızla benzer şekilde farklı araştırmacılar tarafından organik asit ve ultrason ile ilgili gerçekleştirilen inaktivasyon denemelerinde bu yöntemlerin ürünün duyuşal kalite özellikleri üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu veya olumsuz bir etki yaratmadığı bildirilmiştir (Sagong, vd., 2011; Nastou, vd., 2012; Bilek ve Turantaş, 2013; Srey, vd., 2014; Jose, vd., 2014; Silveira, vd., 2018).

Ayrıca genel olarak sonikasyon süresi ve sıcaklığındaki artış ile birlikte duyuşal özelliklerde de kayıp gözlenmiştir. 20°C'de 2 ve 5 dakika sonikasyon işleminde inaktivasyon çözeltilisinin tüm duyuşal özellikler üzerindeki etkisi istatistiksel olarak genellikle önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). 40 ve 50°C'deki sonikasyon koşullarında duyuşal özelliklerde değişim gözlenmiş ve en beğenilen örnekler laktik asit ve PBS ile muamele edilen örnekler olurken en az beğenilen örnek asetik asit ile muamele edilen örnekler olmuştur. Tüm duyuşal özellikler açısından verilen puanlar incelendiğinde kontrol örneği ve laktik asit ile muamele edilen örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Yukarıda da açıklandığı üzere laktik asitin hafif bir asit olması duyuşal özelliklerin korunmasını sağlamıştır.

Genel izlenim açısından 50°C'de 2 ve 5 dakika asetik asit muamelesi hariç diğer tüm inaktivasyon koşullarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Koku ve tat özellikleri bakımından 40°C'deki sonikasyon koşullarında 5 dakika asetik asit ile muamele edilen örnek daha az beğenilmiş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca 50°C'de asetik asit ile muamele edilen örneklerde sürenin etkisi tat, koku ve tekstür özellikleri açısından önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Neal, vd. (2010), ıspanak dekontaminasyonunda uygulanan işlemin renk, tat, aroma, sertlik ve kayganlık gibi duyuşal özelliklere zarar vermemesinin önemini vurgulamıştır. Yaptıkları çalışmada ıspanağın elektron ışını ışınlaması ile organoleptik özelliklerin korunabildiğini bildirmişlerdir. Bu durum duyuşal özelliklerin korunmasında yeni yöntemlerin önemini bir kez daha ortaya çıkarmıştır. Finten vd. ise

(2015), ıspanak yapraklarında bulunan doğal mikrobiyotaya karşı %0.5 sitrik asit ile daldırmalı yıkamanın duyuusal kaliteyi etkilemediğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. Farklı koşullardaki sonikasyon uygulamasına maruz bırakılan ıspanakların duyuusal özellikleri

Örnek	Koku	Renk	Tat	Tekstür	Sululuk	Genel
						İzlenim
2-20	8.50 ^{ab}	9.00 ^a	8.75 ^{ba}	8.75 ^a	8.75 ^{ba}	8.75 ^a
A2-20	8.50 ^{ab}	9.00 ^a	8.75 ^{ba}	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a
L2-20	8.50 ^{ab}	9.00 ^a	8.00 ^{cba}	8.50 ^{ba}	8.50 ^{ba}	8.75 ^a
K5-20	8.75 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	8.75 ^{ba}	9.00 ^a
A5-20	8.50 ^{ab}	8.50 ^a	7.75 ^{cba}	8.50 ^{ba}	8.50 ^{ba}	8.50 ^a
L5-20	9.00 ^a	9.00 ^a	8.25 ^{cba}	9.00 ^a	9.00 ^a	8.75 ^a
K2-40	9.00 ^a	9.00 ^a	8.25 ^{cba}	8.75 ^a	8.50 ^{ba}	8.50 ^a
A2-40	8.50 ^{ab}	9.00 ^a	8.25 ^{cba}	8.50 ^{ba}	8.50 ^{ba}	8.50 ^a
L2-40	9.00 ^a	8.00 ^{ba}	8.25 ^{cba}	8.25 ^{ba}	8.75 ^{ba}	8.50 ^a
K5-40	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	8.50 ^{ba}	8.75 ^{ba}	9.00 ^a
A5-40	7.75 ^b	8.75 ^a	7.00 ^c	8.00 ^{ba}	8.00 ^{ba}	7.75 ^a
L5-40	9.00 ^a	9.00 ^a	8.50 ^{ba}	8.75 ^a	8.75 ^{ba}	9.00 ^a
K2-50	8.50 ^{ab}	8.25 ^a	8.00 ^{cba}	8.25 ^{ba}	8.25 ^{ba}	8.00 ^a
A2-50	6.75 ^c	7.00 ^{cb}	5.50 ^d	6.50 ^c	6.75 ^c	6.25 ^b
L2-50	8.00 ^{ab}	7.75 ^{ba}	7.75 ^{cba}	8.00 ^{ba}	7.75 ^{cba}	7.75 ^a
K5-50	8.50 ^{ab}	8.50 ^a	8.00 ^{cba}	8.25 ^{ba}	8.25 ^{ba}	8.25 ^a
A5-50	6.25 ^c	6.50 ^c	4.25 ^e	5.00 ^d	5.25 ^d	5.50 ^b
L5-50	7.75 ^b	8.25 ^a	7.50 ^{cb}	7.25 ^{cb}	7.50 ^{cb}	7.75 ^a

a-e : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.5 Farklı İnaktivasyon Çözültisi ve Sonikasyon Koşullarının Ispanağın Hücre Yapısı Üzerine Etkisi

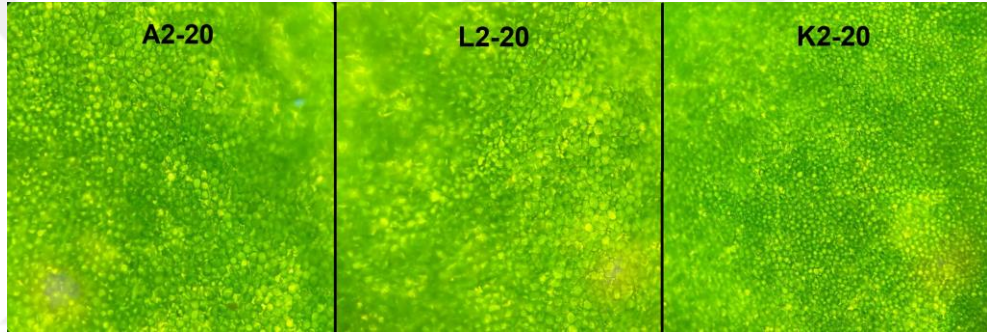
Yapraklı sebzelerde dekontaminasyon işlemlerinin yaprak dokusuna zarar verebilme olasılığı vardır. Nitekim inaktivasyon işlemi seçiminde yaprak dokusu veya hücreleri üzerinde kusur bırakmaması etkili olmaktadır (Ariffin, vd., 2017). Bu çalışmada sonikasyon işlemlerinin yaprak dokusu üzerindeki etkisini belirlemek için mikroskopik gözlemlere başvurulmuş (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8) ve mikroskopik gözlemler sonucu ölçülen hücre çapları Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

İnaktivasyon çözeltilerinin ıspanak hücre çapları üzerindeki etkisi 20°C – 2 sonikasyona maruz bırakılan örnek hariç istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Sıcaklık ve sürenin hücre çapı üzerindeki etkisi PBS ile muamele edilen örneklerin tümünde istatistiksel olarak önemsiz bulunurken laktik asit ve asetik asit ile muamele edilen bazı örneklerde önemli bulunmuştur. Laktik asit ve asetik asit ile muamele edilen örneklerde sıcaklık ve süre artışı ile birlikte hücre çaplarıyla orantılı bir artış veya azalış durumu gözlenmemiştir. Nitekim laktik asit ve asetik asit ile muamele edilen örneklerde sıcaklık ve sürenin hücre çapı üzerine etkisi çoğunlukla istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Mikroskopik gözlemlere göre inaktivasyon koşullarının hücre çapından ziyade yeşil renk dağılımı üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, sebzelerde inaktivasyon işleminden kaynaklı renk değişikliğinin organik asitlerle, ultrasonikasyon kaynaklı kavitasyonla, sıcaklık ve süre artışı ile indüklenebileceği hipotezini desteklemiştir (Jose, vd., 2014; Chen, vd., 2020). Bitkisel dokulara yeşil rengini veren madde klorofildir. Yeşil sebzelerde klorofil miktarı çeşide göre ve uygulana gıda işleme prosesine göre değişebilir. Yeşil yapraklı sebzelere uygulanan ısı işlemi ile birlikte ısı etkisiyle klorofiller çeşitli türevlerine parçalanabilirler. Bu olay asit ortamda ısının etkisiyle daha da hızlı gerçekleşebilir. Asit ve ısı etkisiyle klorofillerin feofitine dönüşümü ile kirli sarı bir renk oluşumu gözlenebilirken; feoforbite dönüşümü ile kirli sarı esmer renk oluşabilir. Hatta ilerleyen aşamada feofitinden pirofeofitin ve feofirbitten ise pirofeoforit oluşur ve böylece kirli esmer renk oluşur (Cemeroğlu, vd., 2001). Şekillerde de görüldüğü üzere çoğunlukla asetik asit ile muamele edilen örneklerde olmak üzere sıcaklık arttıkça yeşil renkte koyulaşma görülmüştür. Özellikle 50°C’de 5 dakika sonikasyon koşullarında asetik asit, laktik asit ve PBS ile muamele edilen örneklerde yeşil renk dağılmış bir biçimde ve daha çok gözlenmiştir. 50°C’de 5 dakika sonikasyon koşullarında dağılmış bir biçimde en yoğun yeşil renk asetik asit ile muamele edilen örneklerde görülmüş ve bunu sırasıyla laktik asit ve PBS ile muamele edilen örnekler izlemiştir.

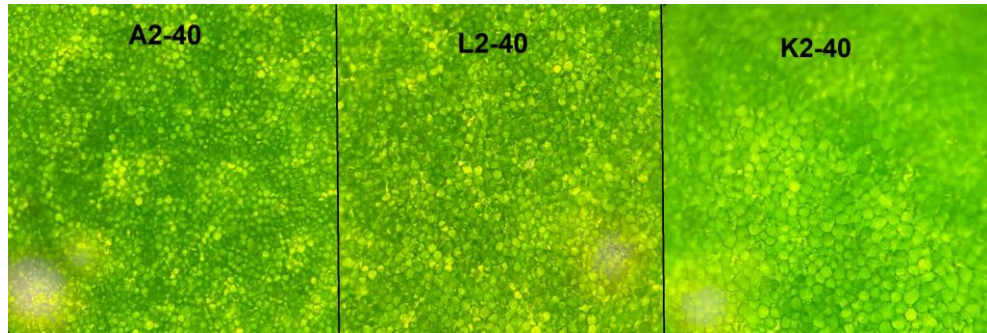
Çizelge 4.4 Farklı koşullardaki sonikasyon uygulamasına maruz bırakılan ıspanakların hücre boyutları
(çap: μm)

Sonikasyon işlem koşulları	Asetik asit (%2)	Laktik asit (%2)	Kontrol (PBS)
20 °C – 2 dakika	31.00±1.41 ^{aA}	31.50 ±2.12 ^{aA}	21.00± 1.41 ^{aB}
40 °C – 2 dakika	27.00 ±1.41 ^{abA}	32.50 ±0.71 ^{aA}	28.00 ±2.83 ^{aA}
50 °C – 2 dakika	24.00 ±1.41 ^{bA}	30.00 ±4.24 ^{abA}	24.50 ±2.12 ^{aA}
20 °C – 5 dakika	30.00 ±2.83 ^{aA}	28.50 ±0.71 ^{abA}	25.50± 0.71 ^{aA}
40 °C – 5 dakika	27.00 ±2.83 ^{abA}	25.50± 0.71 ^{bA}	25.50± 4.95 ^{aA}
50 °C – 5 dakika	28.00 ±2.83 ^{abA}	33.00± 1.41 ^{aA}	27.00± 4.24 ^{aA}

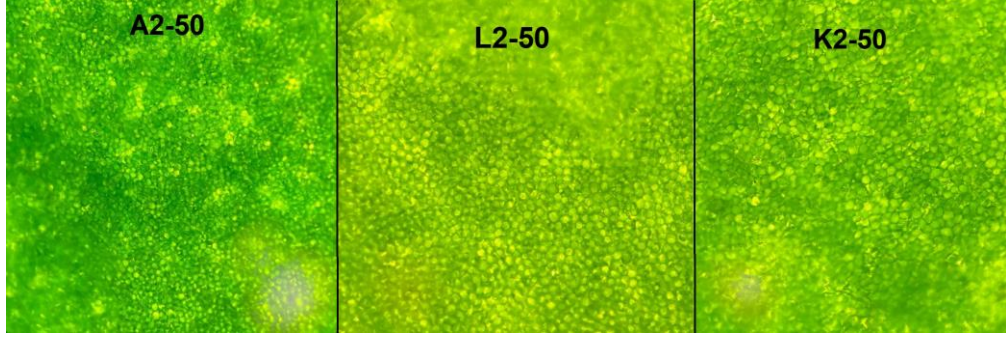
A-B: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). a-b : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).



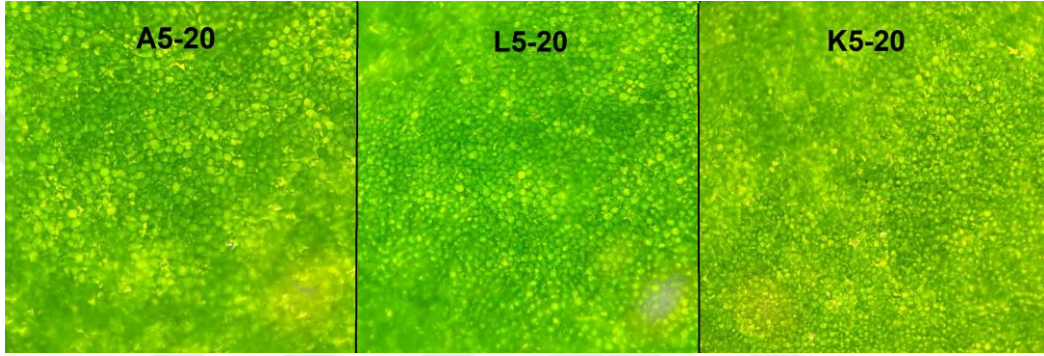
Şekil 4.3 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 20°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü



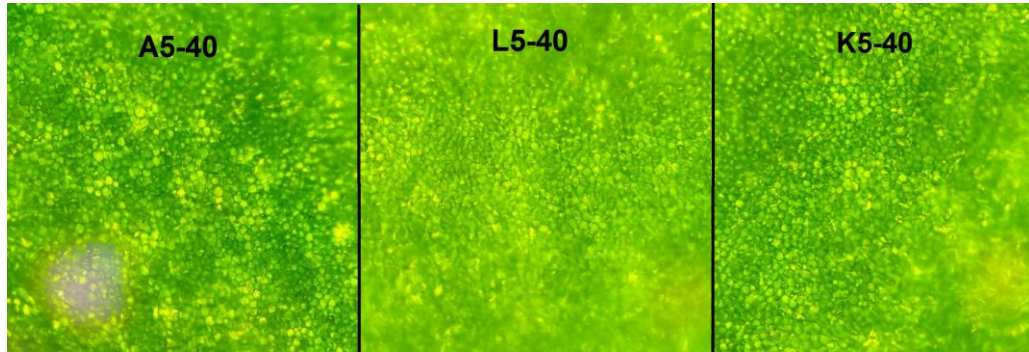
Şekil 4.4 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 40°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü



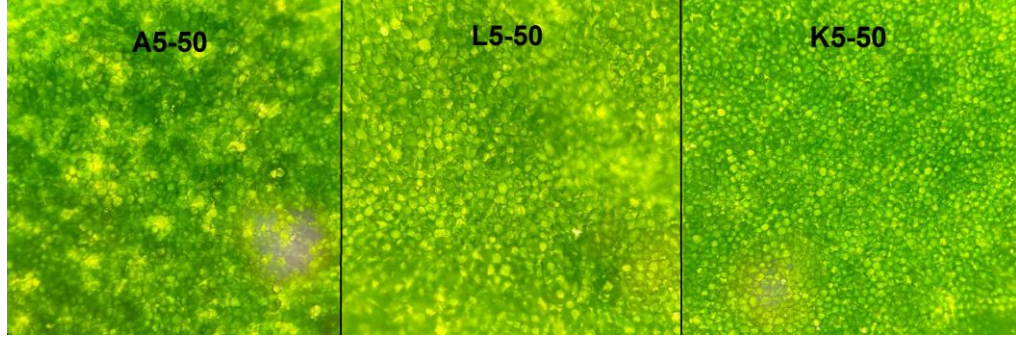
Şekil 4.5 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 50°C’de 2 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.6 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 20°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.7 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 40°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.8 Farklı inaktivasyon çözeltilerinde 50°C’de 5 dakika sonikasyon sonucu ıspanak yapraklarının mikroskopik görüntüsü

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ıspanakta gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerine farklı koşullardaki ultrasonikasyon işleminin etkisi incelenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda sıralanmıştır.

- Ispanakta gelişen *E. coli* biyofilm inaktivasyonu üzerine sıcaklık (20, 40 ve 50°C), süre (2 ve 5 dakika) ve inaktivasyon çözeltisinin (PBS, laktik asit ve asetik asit) etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur.
- Farklı koşullardaki sonikasyon işlemi ile ıspanaktaki *E. coli* biyofilmi canlı hücre sayısında 1.02-6.03 log kob/cm² azalış meydana gelmiştir. Ayrıca canlı hücre sayısı verilerine dayalı yüzde *E. coli* biyofilm inaktivasyon oranı %11.82 ve %69.76 değerleri arasında değişmiştir.
- Ispanakta en yüksek *E. coli* biyofilm inaktivasyonu (6.03 log kob/cm²) 50°C’de 5 dakika sonikasyon koşullarında laktik asit muamelesi ile sağlanırken en düşük biyofilm inaktivasyonu (1.02 log kob/cm²) 20°C’de 2 dakika sonikasyon koşullarında PBS muamelesi ile sağlanmıştır.
- Çoklu doğrusal regresyon analizine göre sıcaklık, süre ve çözelti gibi bağımsız değişkenler birlikte ıspanaktaki *E. coli* biyofilm inaktivasyon oranındaki değişimin %72’sini açıklamaktadır.
- Standartlaştırılmış regresyon katsayılarına göre, bağımsız değişkenlerin biyofilm inaktivasyon oranı üzerindeki göreceli önem sırası, sıcaklık ($\beta=0.660$), çözelti ($\beta=0.469$) ve süre ($\beta=0.266$) olarak belirtilmiştir. Regresyon katsayılarının anlamlılık testleri göz önüne alındığında, bağımsız değişkenlerin

hepsinin (sıcaklık, süre ve çözelti) inaktivasyon oranı üzerinde önemli etkisinin ($p < 0.01$) olduğu görülmüştür

- Duyusal özellikler açısından genellikle en beğenilen örnek PBS (kontrol örneği) ve laktik asit ile muamele edilen örnekler olurken en az beğenilen örnekler asetik asit ile muamele edilen örnekler olmuştur. Sonikasyon sıcaklığının artışı ile birlikte duyuusal beğenide genellikle düşüş olmuştur. Tüm örnekler içerisinde en az beğenilen örnek 50°C’de asetik asit ile muamele edilen örnek olmuş ve tat özelliği bakımından duyuusal kabul kriter değerinin (5 puan) altında puan (4.25) almıştır.
- Mikroskopik gözlemlere göre inaktivasyon koşullarının hücre çapından ziyade yeşil renk dağılımı üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Ağırlıklı olarak asetik asit ile muamele edilen örneklerde olmak üzere sıcaklık arttıkça yeşil rengin dağıldığı ve daha belirgin hale geldiği görülmüştür.
- Bu çalışmanın devamında duyuusal kalite özelliklerini bozmayacak şekilde daha fazla sayıda sıcaklık ve süre aralıklarının ve özellikle de yüzde yüz inaktivasyon sağlayacak parametrelerin denenmesinde fayda görülmektedir. Faktörlerin artırıldığı matematiksel modeller inaktivasyon tahmin boyutunun geliştirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca farklı meyve ve sebzelerdeki patojen biyofilm riski üzerinde çalışmaya devam edilmelidir.
- Daha sonraki çalışmalarda renk ve tekstürel özelliklerin daha ayrıntılı olarak ilgili analizlerle desteklenmesini önerilir. Ayrıca inaktivasyon işleminin ıspanak dokusu ve hücreleri üzerindeki etkisini daha detaylı gözlemlemek için elektron mikroskobuna dayalı gözlemler yapılmasında da fayda görülmektedir.
- Gıda endüstrisinde gıda güvenliğini tehlikeye düşürme potansiyeli olan diğer gıda kaynaklı patojen biyo filmleri üzerinde de benzer çalışmalar yapılmalı ve böylece hem gıda endüstrisinin hem de gıda alanında çalışan devlet kurumlarının yararına olan veriler sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abadias M., Alegre I., Oliveira M., Altisent R., Viñas I., Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions, *Food Control*, 27, 37-44, 2012.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N., Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments, *Arch. Microbiol*, 196, 453–472, 2014.
- Addo K. A., Li H., Yu Y., Xiao X., Unraveling the mechanism of the synergistic antimicrobial effect of cineole and carvacrol on *Escherichia coli* O157:H7 inhibition and its application on fresh-cut cucumbers, *Food Control*, 144, 109339, 2023.
- Ailes, E. C., Leon, J. S., Jaykus, L. A., Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season, *Journal of Food Protection*, 71(12), 2389–2397, 2008.
- Akbaş, M.Y., Ölmez, H., Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids, *Letters in Applied Microbiology*, 44, 619-624, 2007.
- Alborzi, S., Bastarrachea, L.J., Ding, Q., Tikekar, R.V., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua* by benzoic acid, ethylenediaminetetraacetic acid and their combination in model wash water and simulated spinach washing, *Journal of Food Science*, 1-9, 2018.
- Alexandre, E.M.C., Santos-Pedro, D.M., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress, *J. Food Eng.* 105 (2), 277-282, 2011.
- Alexander, E.M.C., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., Assessment of the impact of hydrogen peroxide solutions on microbial loads and quality factors of red bell peppers, strawberries and watercress, *Food Control*, 27, 362-368, 2012.
- Al-Haq, M.I., Sugiyama, J., Isobe, S., Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries, *Food Science Technology Research*, 11, 135-150, 2005.
- Almasoud, A., Hettiarachchy, N., Rayaprolu, S., Horax, R., Eswaranandam, S., Electrostatic spraying of organic acids on biofilms formed by *E.coli* O157:H7

- and *Salmonella Typhimurium* on fresh produce, Food Research International, 78, 27-33, 2015.
- Almasoud A., Hettiarachchy N., Rayaprolu S., Babu D., Kwon Y. M., Mauromoustakos A., Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*, LWT - Food Science and Technology, 66, 560-564, 2016.
- Amrutha, B., Sundar, K., Shetty, P.H., Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables, Microbial Pathogenesis, 111, 156-162, 2017.
- Andrews J.H. and Harris R.F., The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces, Annu Rev Phytopathol, 38, 145–180, 2000.
- Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri. GDM 203 Genel Mikrobiyoloji, Doç.Dr.Pınar ŞANLIBABA, <https://acikders.ankara.edu.tr/course/view.php>.
- Annous B.A., Sapers G.M., Mattrazzo A.M., Riordan D.C.R., Efficacy of washing with a commercial flatbed brush washer, using conventional and experimental washing agents, in reducing populations of *Escherichia coli* on artificially inoculated apples, Journal of Food Protection, 64, 159–163, 2001.
- Annous, B. A., Fratamico, P. M., & Smith, J. L., Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do, Journal of Food Science, 74(1), 2009.
- Ariffin, S.H., Gkatzionis, K., Bakalis, S., Leaf injury and its effect towards shelf-life and quality of ready-to-eat (RTE) spinach, Energy Procedia, 123, 105-112, 2017.
- Avila, C. R., Hascoet, A. S., Guerrero-Navarro, A. E., Rodríguez-Jerez, J. J., Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces, Food Control, 92, 240-248, 2018.
- Babic, I., Roy, S., Watada, A. E., Weigin, W. P., Changes in microbial populations on fresh cut spinach, International Journal of Food Microbiology, 31, 107–19, 1996.
- Bai, M., Dai, J., Li, C., Cui, H., Lin, L., Antibacterial and antibiofilm performance of low-frequency ultrasound against *Escherichia coli* O157:H7 and its application in fresh produce, International Journal of Food Microbiology, 400, 110266, 2023.

- Bang, H. J., Park, S. Y., Kim, S. E., Rahaman, M. M. F., Ha, S. D., Synergistic effects of combined ultrasound and peroxy acetic acid treatments against *Cronobacter sakazakii* biofilms on fresh cucumber, *LWT-Food Science and Technology*, 84, 91-98, 2017.
- Bari, M. L., Nakauma, M., Todoriki, S., Juneja, V. K., Isshiki, K., Kawamoto, S., Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature, *Journal of Food Protection*, 68(2), 318-323, 2005.
- Bauman, A. R., Martin, S. E., Feng, H., Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone, *Journal of Food Protection*, 72 (6), 1306-1309, 2009.
- Beattie, G. A. And Marcell, L. M., Effect of alterations in cuticular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces, *Plant, Cell & Environment*, 25, 1–16, 2002.
- Beck-Friis, B., Smars, S., Jonsson, H., Eklind, Y., Kirchmann, H., Composting of source-separated household organics at different oxygen levels: gaining an understanding of the emission dynamics, *Compost Science & Utilization*, 11, 41-50, 2003.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogensemi, *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397, 2010.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., Meinersmann, R. J., Effect of chemical sanitizers with and without ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a biofilm within polyvinyl chloride drain pipes, *Journal of Food Protection*, 71(1), 66-69, 2008.
- Beuchat, L. R. and Ryu, J. H., Produce handling and processing practices, *Emerging Infectious Diseases*, 3, 459– 465, 1997.
- Bilek, S. E. and Turantaş, F., Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review, *International Journal of Food Microbiology*, 166, 155-162, 2013.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Jensen, P. Q., Nielsen, A. K., Johansen, H. K., Homque, P., Hoiby, N., Givskov, M., Moller, K. K., Antibiofilm properties of acetic acid, *Advances in Wound Care*, 4(7), 363-371, 2015.

- Bolin, H. R., Stafford, A. E., King Jr., A. D., Huxsoll, C. C., Factors affecting the storage stability of shredded lettuce, *Journal of Food Science*, 42, 1319–1324, 1977.
- Bott, T. R., Tianging, L., Ultrasound enhancement of biocide efficiency, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 323-326, 2004.
- Boyer, R., Sumner, S. S., Williams, R. C., Pierson, M. D., Popham, D. L., Kniel, K. E., Influence of curli expression by *Escherichia coli* O157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce, *Journal of Food Protection*, 70, 1339–1345, 2007.
- Braiek, O. B., Smaoui, S., Chemistry, safety, and challenges of the use of organic acids and their derivative salts in meat preservation, *Hindawi Journal of Food Quality*, 1-20, 2021.
- Brandl, M. T., Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157 : H7 on postharvest lettuce, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5285–5289, 2008.
- Birmpa, A., Sfika, V., Vantakaris, A., Ultraviolet light and ultrasound as nonthermal treatments for inactivation of microorganisms in fresh read-to-eat foods, *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 96-102, 2013.
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan, *Plos One*, 10 (4), 1–20, 2015.
- Camargo, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., Nero, L. A., *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian Scenario, *Foodborne Pathogens and Diseases*, 14, 623–636, 2017.
- Can, A., SPSS ile Bilimsel Araştırma Sürecinde Nicel Veri Analizi, PEGEM Akademi, 5. Baskı, ISBN: 978-605-364-448-4, Kızılay/ANKARA, 429, 2019.
- Carmichael, I., Harper, I. S., Coventry, M. J., Taylor, P. W. J., Wan, J., Hickey, M. W., Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85, 45-51, 1999.
- Carter, M. Q. and Brandl, M. T., Biofilms in fresh vegetables and fruits, *Produce Safety and Microbiology Research Unit*, 2015.

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Food Safety, Foodborne outbreaks, Available at <http://www.cdc.gov/foodsafety>, Accessed 8 June 2018.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Outbreak of *E. coli* infections linked to leafy greens, Accessed 29 November 2021.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Meyve ve sebzelerin bileşimi soğukta depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Başkent Klişe Matbaacılık, Ankara, 2001.
- Chaudry, M. A., Bibi, N., Khan, M., Badshah, A., Qureshi, M. J., Irradiation treatment of minimally processed carrots for ensuring microbiological safety, *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 169-173, 2004.
- Chen, F., Zhanga, M., Yang, C., Application of ultrasound technology in processing of ready-to-eat fresh food: A review, *Ultrasonics – Sonochemistry*, 63, 104953, 2020.
- Chhetri, V. S., Janes, M. E., King, J. M., Doerrler, W., Adhikari, A., Effect of residual chlorine and organic acids on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on spinach leaves during storage, *LWT - Food Science and Technology*, 105, 298–305, 2019.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry, *Pathogens*, 6(3), 41, 2017.
- Cossu, A., Ercan, D., Wang, Q., Peer, W. A., Nitin, N., Tikekar, R. V., Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 44–52, 2016.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., Ordonez, A. A., New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-21, 2017.
- Cui, H., Ma, C., Lin, L., Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on lettuce, *Food Control*, 66, 8-16, 2016.
- Cui, H., Bai, M., Yuan, L., Surendhiran, D., Lin, L., Sequential effect of phages and cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on different vegetables, *International Journal of Food Microbiology*, 268, 1-9, 2018.

- Davidson, P. M., Critzer, F. J., Matthew Taylor, T., Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods, *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 163–190, 2013.
- Delaquis, P. J., Stewart, S., Toivonen, P. M. A., Moyls, A. L., Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce, *Food Research International*, 32(1), 7-14, 1999.
- Delaquis, P., Stewart, S., Cazaux, S., Toivonen, P., Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in ready-to-eat lettuce washed in warm chlorinated water, *Journal of Food Protection*, 65, 459–464, 2002.
- Delaquis P., Bach S., Dinu L. D., International association for food protection review behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables, *Journal of Food Protection*, 70(8), 1966–1974, 2007.
- De-Waal, C.S. and Bhuiya, F., (2007), *Outbreak alert! Closing the gaps in our federal food-safety net*, 9th ed. Center for Science in the Public Interest, Washington, DC, http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak_alert.pdf.
- Doyle, M. P. and Erickson, M. C., The problems with fresh produce: An overview, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 317–330, 2008.
- Duffy, E. A., Lucia, L. M., Kells, J. M., Castillo, A., Pillai, S. D., Acuff, G. R., Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas, *Journal of Food Protection*, 68(1), 70–79, 2005.
- Elhariry, H. M., Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce, *Food Microbiology*, 28, 1266-1274, 2011.
- Erol, H., *SPSS Paket Programı ile İstatistiksel Veri Analizi*, Nobel Kitabevi, 548s, ANKARA, 2010.
- Erriu, M., Blus, C., Moncler S. S., Buogo, S., Levi, R., Barbato, G., Madonnaripa D., Denotti, G., Piras, V., Orru, G., Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21,15-22, 2014.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G., Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*, *Journal of Food Science*, 69, 79-84, 2004.

- Fatemi, P. and Knabel, S. J., Evaluation of sanitizer penetration and its effect on destruction of *Escherichia coli* O157 : H7 in Golden Delicious apples, *Journal of Food Protection*, 69(3), 548–555, 2006.
- FDA (Food and Drugs Administration), Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables, <http://www.foodsafety.gov/dms/prodguid>. Accessed 8 December 1998.
- Fett, W. F. and Cooke, P. H., Scanning electron microscopy of native biofilms on mung bean sprouts, *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 45–50, 2003.
- Fındık, S., Gündüz, G., Gündüz, E., Direct sonication of acetic acid in aqueous solutions, *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 203–207, 2006.
- Finten, G., Finten, F., Agüero, M. V., Jagus, R. J., Effectiveness of citric acid as a substitute for sodium hypochlorite in washing spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.), Secretariat of Science and Technology, 2015.
- Frank, C., Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, *New England Journal of Medicine*, 365(19), 1771–1780, 2011.
- Gagliardi, J. V., Millner, P. D., Lester, G., Ingram, D., On-farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds, *Journal of Food Protection*, 66, 82–87, 2003.
- Galie, S., García-Gutiérrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J., Lombo, F., Biofilms in the food industry: health aspects and control methods, *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-18, 2018.
- Ganesh, V., Hettiarachchy, N. S., Ravichandran, M., Johnson, M. G., Griffis, C. L., Martin, E. M., Electrostatic sprays of food-grade acids and plant extracts are more effective than conventional sprays to decontaminate *Salmonella Typhimurium* on spinach, *Journal of Food Science*, 75(9), 574-579, 2010.
- Garcia, A., Mount, J. R., Davidson, P. M., Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce, *Food Microbiol*, 68, 2747–2751, 2003.
- Garcia, A., Mount, J. R., Davidson, P. M., Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce, *Journal of Food Science*, 68, 2747–2751, 2006.
- Garrett, E. H., Gorny, J. R., Beuchat, L. R., Farber, J. N., Harris, L. J., Parish, M. E., Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: description of the

- situation and economic impact, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 13–19, 2003.
- Gomez, F., Chaves, A., Bartoli, C. G., Guiamet, J. J., Fernandez, L., Gergoff, G., Heat shock increases mitochondrial H₂O₂ production and extends postharvest life of spinach leaves [electronic resource], *Postharvest Biology and Technology*, 49, 229-234, 2008.
- Goodburn, C., Wallace, C. A., The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review, *Food Control*, 32, 418-427, 2013.
- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A. M. Hale, G., Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3284–3290, 2006.
- Handscur, M., Pinar, G., Gallist, B., Lubitz, W., Haslberger, A. G., Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing, *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(11), 1595–1605, 2005.
- Hu, X., Chen, F., Wang, P., Chen, Z., The Importance of Food Safety for Fruits and Vegetables, *Food Safety in China: Science Technology*, 489, 2017.
- Huang, Y., Ye, M., Chen, H., Efficacy of washing with hydrogen peroxide followed by aerosolized antimicrobials as a novel sanitizing process to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 on baby spinach, *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 306-313, 2012.
- Huang, Y., Chen, H., Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on baby spinach, *Food Control* 22 (8), 1178-1183, 2011.
- Huang, K., Wrenn, S., Tikekar, R., Nitin, N., Efficacy of decontamination and a reduced risk of cross-contamination during ultrasound-assisted washing of fresh produce, *Journal of Food Engineering*, 224, 95-104, 2018.
- Huang, T. S., Xu, C., Walker, K., West, P., Zhang, S., Weese, J., Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce, *Journal of Food Science*, 71 (4), 134-139, 2006.

- Ingham, S. C., Losinski, J. A., Andrews, M. P., Breuer, J. E., Breuer, J. R., Wood, T. M., Wright, T. H., *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with non-composted bovine manure: Garden-scale studies, *Applied Environmental Microbiology*, 70, 6420–6427, 2004.
- Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., Escartín, E. F., Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature, *Journal of Food Protection*, 70(1), 30–34, 2007.
- Iwasa, M., Makino, S., Asakura, H., Kobori, H., Morimoto, Y., Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan, *Journal of Medical Entomology*, 36: 108–112, 1999.
- Jahid, I. K., Han, N., Zhang, C. Y., Ha, S. D., Mixed culture biofilms of *Salmonella Typhimurium* and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma, *Food Microbiology*, 46, 383-394, 2015.
- Jayasooriya, S. D., Bhandari, B. R., Torley, P., D'Arcy, B. R., Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review, *International Journal of Food Properties*, 7 (2), 301-319, 2004.
- Jiang, Q., Zhang, M., Xu, B., Application of ultrasonic technology in postharvested fruits and vegetable storage: A review, *Ultrasonics – Sonochemistry*, 69, 105261, 2020.
- Johannessen, G. S. and Cudjoe, K. S., Regulatory issues in Europe regarding fresh fruit and vegetable safety, *The Produce Contamination Problem*, 331-352, 2014.
- Jose J. F. B. S., Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C., Chaves, J. B. P., Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables, *Food Control*, 45, 36-50, 2014.
- Joshi, K., Mahendran, R., Alagusundaram, K., Norton, T., Tiwari, B.K., Novel disinfectants for fresh produce, *Trends in Food Science & Technology*, 34, 54-61, 2013.
- Kim, S. Y., Kang, D. H., Kim, J. K., Ha, Y. G., Hwang, J. Y., Kim, T., Lee, S. H., Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce, *Journal of Food Science*, 76(1), 1-7, 2011.

- Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P., Carle, R., Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination, *Innovative Food Science and Emerging Technologies (IFSET)*, 6, 351-362, 2005.
- Lencova, S., Zdenkova, K., Demnerova, K., Stiborova, H., Short communication: Antibacterial and antibiofilm effect of natural substances and their mixtures over *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *LWT - Food Science and Technology*, 154(112777), 2022.
- Lieleg, O., Caldaraa, M., Baumgartela, R., Ribbeck, K., Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Soft Matter*, 7, 3307-3314, 2011.
- Lindow, S. E. and Brandl, M. T., Microbiology of the phyllosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 1875–1883, 2003.
- Li, Y., Brackett, R. E., Chen, J., Beuchat, L. R., Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 and 15 °C, *Journal of Food Protection*, 64, 305–309, 2001.
- Lopez-Velasco, G., Davis, M., Boyer, R. R., Williams, R. C., Ponder, M. A., Alterations of the phylloepiphytic bacterial community associated with interactions of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of packaged spinach at refrigeration temperatures, *Food Microbiology*, 27(4), 476–486, 2010.
- Lopez-Velasco, G., Welbaum, G. E., Falkinham J. O., Ponder, M. A., Phyllosphere bacterial community structure of spinach (*Spinacia oleracea*) as affected by cultivar and environmental conditions at time of harvest, *Diversity* 3, 721–738, 2011.
- Macarisin, D., Patel, J., Bauchan, G., Giron, J. A., Sharma, V. K., Role of curli and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach leaves, *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, 160–167, 2012.
- Macarisin, D., Patel, J., Sharma, V. K., Role of curli and plant cultivation conditions on *Escherichia coli* O157: H7 internalization into spinach grown on hydroponics and in soil, *International Journal of Food Microbiology* ,173, 48–53, 2014.
- Majid, I., Nayik, G. A., Nanda, V., Ultrasonication and food technology: A review, *Cogent Food & Agriculture*, 1,1-11, 2015.

- Mamvura, T. A., Biofilm control on stainless steel surface to optimise hygiene, process conditions and corrosion resistance, PhD Thesis, Faculty of Engineering and the Built Environment, University of Witwatersrand, 305, 2014.
- Mansvelt, E. L., Hattingh, M. J., Scanning electron-microscopy of pear blossom invasion by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, Canadian Journal of Botany, 65(12), 2523–2529, 1987.
- Markland, S. M., Shortlidge, K. L., Hoover, D. G., Yaron, S., Patel, J., Singh, A., Sharma, M., Kniel, K. E., Survival of pathogenic *Escherichia coli* on basil, lettuce, and spinach, Zoonoses and Public Health, 60, 563–571, 2012.
- Medeiros, L. C., Hillers, V. N., Kendall, P. A., Mason, A., Food safety education: What should we be teaching consumers, Journal Nutrition Education, 33(2), 108–114, 2001.
- Melcon, C. R., Peláez, F. R., Fernández, C. G., Calleja, C. A., Capita, R., Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride, Food Microbiology, 82, 533-540, 2019.
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., Grayson, M. L., In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria, Journal of Applied Bacteriology, 79(4), 475e479, 1995.
- Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A. C., Talley, J., Gilliland, S., Fletcher, J., Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach, Journal of Food Protection, 72:1521–1530, 2009.
- Mnkeni, P. N. S., Cisneros, B. J., Phasha, M. C., Austin, L. M., Use of human excreta from urine-diversion toilets in food gardens: Agronomic and health aspects, Water Resource Commission, 3, 1–40, 2006.
- Monterey County Agricultural Commissioner, 2007. Monterey County crop report 2006. Monterey County Agricultural Commissioner's Office, Salinas. Available at: <http://www.co.monterey.ca.us/ag/pdfs/cropreport2006.pdf>. Accessed 7 January 2008.
- Morris, C. E., Monier, J. M., Jacques, M. A., Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable

- microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1570–1576, 1997.
- Morris, C. and Monier, J. M., The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, 41, 429–453, 2009.
- Murata, M., Tanaka, E., Minoura, E., Homma, S., Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68(3), 501-507, 2004.
- Nadell, C. D. and Bassler, B. L., A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms, *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 108, 14181-14185, 2011.
- Nastou, A., Rhoades, J., Smirniotis, P., Makri, I., Kontominas, M., Likotrafiti, E., Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables, *International Journal of Food Microbiology*, 159, 247-253, 2012.
- Neal, J. A., Booren, B., Zevallos, L. C., Miller, R. K., Lucia, L. M., Maxim, J. E., Castillo, A., Shelf life and sensory characteristics of baby spinach subjected to electron beam irradiation, *Journal of Food Science*, 75, 319-326, 2010.
- Niemira, B. A., Fan, X., Sokorai, K. J., Sommers, C. H., Ionizing radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Cichorium endiva*), *Journal of Food Protection*, 66, 993–998, 2003.
- Niemira, B. A., Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of Romaine lettuce and baby spinach, *Journal of Food Protection*, 70, 2526–2532, 2007.
- Niemira, B. A., Irradiation compared with chlorination for elimination of *Escherichia coli* O157:H7 internalized in lettuce leaves: influence of lettuce variety, *Journal of Food Science*, 73, 208–213, 2008.
- Nieuwenhuijsen, M. J., Toledano, M. B., Elliott, P., Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for exposure

- assessment in epidemiological studies, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 10(6), 586–599, 2000.
- Nikolaev, Y. A. and Plakunov, V. K., Biofilm —“City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *International Journal of Molecular Sciences*, 76, 125–138, 2007.
- Nishikawa, T., Yoshida, A., Khanal, A., Habu, M., Yoshioka, I., Toyoshima, K., Takehara, T., Nishihara, T., Tachibana, K., Tominaga, K., A study of the efficacy of ultrasonic waves in removing biofilms, *Gerodontology*, 27, 199-206, 2010.
- Ölmez, H., Temur, S. D., Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce, *LWT-Food Science and Technology*, 43, 964–970, 2010.
- Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garret E. H., Farber, J. N., Busta, F. F., Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161-173, 2003.
- Park, S. H., Choi, M. R., Park, J. W., Park, K. H., Chung, M. S., Ryu, S., Kang, D. H., 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), 293-298, 2011.
- Park Y. J. and Chen, J., Control of the biofilms formed by curli- and cellulose-expressing shiga toxin–producing *Escherichia coli* using treatments with organic acids and commercial sanitizers, *Journal of Food Protection*, 78(5), 990–995, 2015.
- Park, S. Y., Song, H. H., Ha, S. D., Synergistic effects of NaOCl and ultrasound combination on the reduction of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in raw laver, *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5), 373-378, 2014.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R. C., Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207-216, 2003.
- Rajwar, A., Srivastava, P., Sahgal, M., Microbiology of fresh produce: route of contamination, detection methods, and remedy, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2383–2390, 2016.
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Von Bodman, S. B., Fuqua, C., Biofilm formation in plant-microbe associations, *Current Opinion in Microbiology*, 7, 602–609, 2004.

- Roth, L., Simonne, A., House, L., Ahn, S., Microbiological analysis of fresh produce sold at Florida farmers' markets, *Food Control*, 92, 444–449, 2018.
- Roura, S. I., Valle, C. E., Pereyra, L., Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heatmild shocks and chemical additives [electronic resource], *Food Science and Technology*, 41, 919-924, 2008.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M. A., GonzálezAguilar, G. A., Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots, *Food Control* 18, 1383-1390, 2007.
- Ruppel, S., Krumbein, A., Schreiner, M., Composition of the phyllospheric microbial populations on vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions, *Microbial Ecology*, 56, 364–372, 2008.
- Borges-Baldotto, L. E., Lopes-Olivares, F., Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system, *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 918–931, 2008.
- Saeeduddin, Khanzada, A. W. K., Dissociation constant studies of lactic acid at different temperatures and in mixed organic water solvent systems, *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 26(1), 23-27, 2004.
- Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J., Kang, D. H., Combined effect of ultrasound and organic acids tor educe *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce, *International Journal of Food Microbiology*, 145, 287-292, 2011.
- Sango, D. M., Abela, D., McElhatton, A., Valdramidis, V. P., Assisted ultrasound applications for the production of safe foods, *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1067-1083, 2014.
- Sapers, G. M., Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables, *Microbiology of fruits and vegetables*, 376–387, 2005.
- Sarkinas, A., Sakalauskiene, K., Raisutis, R., Zeime, J., Salaseviciene, A., Puidaite, E., Mockus, E., Cernauskas, D., Inactivation of some pathogenic bacteria and phytoviruses by ultrasonic treatment, *Microbial Pathogenesis*, 123, 144-148, 2018.

- Sela, S., Microbial quality and safety of fresh produce, in Postharvest Handling: A Systems Approach, Academic Press, Cambridge, MA, USA, 2009.
- Sela, S., Nestel, D., Pinto, R., Nemny-Lavy, E., Bar-Joseph, M., Mediterranean fruit fly as a potential vector of bacterial pathogens, Applied and Environmental Microbiology, 71, 4052–4056, 2005.
- Sethi, S., Nayak, S. L., Joshi, A., Sharma, R. R., Sanitizers for fresh-cut fruits and vegetables. In Fresh-cut fruits and vegetables: Technologies and mechanisms for safety control, Academic Press, 99-119, 2019.
- Seymour, I. J., Burfoot, D., Smith, R. L., Cox., L. A., Lockwood, A., Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables, International Journal of Food Science and Technology, 37: 547-557, 2002.
- Sheen, S., Huang, C. Y., Ramos, R., Chien, S. Y., Scullen, O. J., Sommers, C., Lethality prediction for *Escherichia coli* O157:H7 and uropathogenic *E. Coli* in ground chicken treated with high pressure processing and trans-cinnamaldehyde, Journal of Food Science, 1-10, 2018.
- Silveira, L. O., Rosario, D. K. A., Giori, A. C. G., Oliveira, S. B. S., Mutz, Y. S., Marques, C. S., Coelho, J. M., Bernardes, P. C., Combination of peracetic acid and ultrasound reduces *Salmonella Typhimurium* on fresh lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*), Journal of Food Science and Technology, 55(4), 1535-1540, 2018.
- Singla, R., Ganguli, A., Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 118, 34-40, 2014.
- Sivapalasingam S., Friedman C. R., Cohen, L., Tauxe, R. V., Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997, Journal of Food Protection, 67, 2342–2353, 2004.
- Solomon, E. B., Potenski, C. J., and Matthews, K. R., Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce, Journal of Food Protection, 65, 673–676, 2002.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. D., Biofilm formation in food industries: A food safety concern, Food Control, 31: 572-585, 2013.
- Srey, S., Park, S. Y., Jahid, I. K., Ha, S. D., Reduction effect of the selected chemical and physical treatments to reduce *L. monocytogenes* biofilms formed on lettuce and cabbage, Food Research International, 62, 484-49, 2014.

- Ssemanda, J. N., Joosten, H., Bagabe, M. C., Zwietering, M. H., Reij, M. W., Reduction of microbial counts during kitchen scale washing and sanitization of salad vegetables, *Food Control*, 85, 495-503, 2018.
- Stopforth, J. D., Samelis, J., Sofos, J. N., Kendal, P. A., Smith, G. C., Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces, *Food Microbiology*, 20, 651-660, 2003.
- Sundberg, C. and Jonsson, H., Process inhibition due to organic acids in fed-batch composting of food waste -influence of starting culture, *Biodegradation*, 16, 205-213, 2005.
- Sengun, I. Y. and Karapinar, M., Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.), *International Journal of Food Microbiology*, 96, 301–305, 2004.
- Sengun, I.Y., and Karapinar, M., Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.), *International Journal of Food Microbiology*, 98, 319–323, 2005.
- Takundwaa, B. A., Bhagwat, P., Ruzengwe, F. M., Pillai, S., Ijabadeniyi, O. A., Optimisation of the combined treatment of nisin, oregano and ultrasound in decontaminating *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cabbage, *Future Foods*, 5, 100141, 2022.
- Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., DeSilva, U., Gilliland, S. E., Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by house flies (Diptera: Muscidae), *Journal of Food Protection*, 72: 1547–1552, 2009.
- Turhan, E.U. and Erginkaya, Z., Gıda endüstrisindeki biyofilmlerin önlenmesinde biyolojik yaklaşımlar, 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016), 430, Adana/Turkey, Sözlü Sunum, 26-28 October 2016.
- Turhan, E. U., Erginkaya, Z., Uney, M. H., Ozer, E. A., Inactivation effect of probiotic biofilms on growth of *Listeria monocytogenes*, *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 23 (4), 541-546, 2017.

- Ugarte-Romero, E., Feng, H., Martin, S. E., Cadwalder, K. R., Robinson, S.,
Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider, *Journal of Food Science*, 71 (2), 102-108, 2006.
- Uhlich, G. A., Sinclair, J. R., Warren, N. G., Chmielecki, W. A., Fratamico P.,
Characterizaion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with two multistate foodborne outbreaks that occurred in 2006, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1268–1272, 2008.
- USFDA, United States Food and Drug Administration, Irradiation in the production, processing and handling of food, *Federal Register*, 73:49593–03, 2008.
- Vacheethasanee, K., Temenoff, J. S., Higashi, J. M., Gary, A., Anderson, J. M., Bayston, R., Marchant, R. E., Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene, *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(3), 425–32, 1998.
- Van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K., Uyttendaele, M., Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2850–2861, 2013.
- Vidacs, A., Kerekes, E., Rajko, R., Petkovits, T., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Vagvölgyi, C., Krisch, J., Optimization of essential oil-based natural disinfectants againts *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces, *Journal of Molecular Liquids*, 255, 257-262, 2018.
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J., Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorinedemanding substrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5022–5028, 2005.
- Warriner, K., Ibrahim, F., Dickinson, M., Wright, C., Waites, W. M., Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants, *Journal of Food Protection*, 66, 1790–1797, 2003.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D. A. C., Bending, G. D., Chapter 7 human pathogens and the phyllosphere, *Advances in Applied Microbiology*, 64, 183–221, 2008.
- WHO (World Health Organization), 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/E.coli>.

- Yakut, M., Tangel, A., Tangel, C., A microcontroller based generator design for ultrasonic cleaning machines, *Journal of Electrical & Electronics Engineering*, 9, 853-860, 2009.
- Yaron, S., Romling, U., Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7 (6), 496–516, 2014.
- Yu, H., Liu, Y., Li, L., Guo, Y. H., Xie, Y. F., Cheng, Y. L., Yao, W. R., Ultrasoundinvolved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms, *Trends in Food Science and Technology*, 96, 91–101, 2020.
- Yuk, H. G., Yoo, M. Y., Yoon, J. W., Moon, K. D., Marshall, D. L., Oh, D. H., Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on lettuce, *Journal of Food Science*, 71(3), 1-6, 2006.
- Zhang, X., Zhou, D., Cao, Y., Zhang, Y., Xiao, X., Liu, F., Synergistic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by gallic acid and thymol and its potential application on fresh-cut tomatoes, *Food Microbiology*, 102(103925), 2022.
- Zhao, X., Zhen, Z., Wang, X., Guo, N., Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34 (12), 2058–2068, 2017.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Melis KOCA
2. Doğum Tarihi :
3. Ünvanı : Beslenme ve Diyetetik Uzmanı
4. Öğrenim Durumu : Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Selçuk Üniversitesi	2020
Yüksek Lisans	Gıda Teknolojisi	Korkut Ata Üniversitesi	Aktif

5. İş Tecrübesi:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Çağrı Karşılama Memuru	Kilis 112 Acil Çağrı Merkezi Müdürlüğü	2021- Aktif

6. Yayınlar:

7. Yazılan uluslar arası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

8. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

8.1 Koca, M., Koca, E.E., Ünal Turhan, E. 2024. Beslenme ve fiziksel aktivitenin bağırsak mikrobiyotası ile ilişkisi, Food and Health, 10(2), 160-168.

9. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

9.1 Ünal Turhan, E., Koca, M., Koca, E.E., 2024. Çiğ Tüketilen Meyve ve Sebzelerde Yüzey Dekontaminasyonu, 4. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar ve Yenilikçi Çalışmalar Sempozyumu (ISSRIS'24), 13-16 March 2024.

10. Diğer yayınlar:

11. Projeler:

12. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler: Dergi Park Akademi



T.C.
OSMANİYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ ÇALIŞMASI BENZERLİK RAPORU FORMU
(SAVUNMA SONRASI)

FORM
TEZLİ YL-24

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı	Melis KOCA
Öğrenci Numarası	2111901102
Ana Bilim/ Ana Sanat Dalı	Gıda Teknolojisi
Danışman Unvanı, Adı-Soyadı	Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN
Tez Başlığı (Türkçe)	Ispanakta Gelişen Escherichia Coli Biyofilmlerinin Termosonikasyon ve Organik Asit Muamelesiyle Dekontaminasyonu

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Özet ve Abstract c) Giriş, d) Ana bölümler, e) Sonuç ve f) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 08 /07 /2024 tarihinde Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 7 'tür.

Filtreleme Tip 1 (maksimum %30)

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç,
- 3- Alıntılar dâhil.

Filtreleme Tip 2 (maksimum %10)

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç,
- 3- Alıntılar hariç,
- 4- 5 Kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Çalışması Benzerlik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
Öğrenci

Danışman Onayı
UYGUNDUR

Unvanı, Adı Soyadı
(İmzası)

Enstitü Onayı
UYGUNDUR

Adı Soyadı
(İmzası)

AÇIKLAMALAR

1. Lisansüstü tezler, savunma öncesinde benzerlik raporu ile birlikte Enstitüye teslim edilir.
2. Benzerlik raporu ile ilgili olarak etik kurallar dâhilindeki benzerlik oranları ilgili Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenir. (Enstitü Yönetim Kurulu tarafından tezin, intihal kapsamı dışında değerlendirilmesi için TURNITIN'den alınan raporda "benzerlik oranı"nın, "alıntılar hariç" en fazla %10, "alıntılar dahil" % 30'u geçmemesi şeklinde kabul edilmiştir).