T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İŞLENMEMİŞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN DOĞAL ANTİMİKROBİYALLERLE ENGELLENMESİ VE OLUŞAN BİYOFİLMİN ORTADAN KALDIRILMASI

Tuğba KÖKÜMER
Yüksek Lisans Tezi
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İŞLENMEMİŞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN DOĞAL ANTİMİKROBİYALLERLE ENGELLENMESİ VE OLUŞAN BİYOFİLMİN ORTADAN KALDIRILMASI

Tuğba KÖKÜMER

Yüksek Lisans Tezi

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2013

YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.01.2013 tarih ve 2013/03.. sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/01/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tuğba KÖKÜMER'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. İnci ÖZDEMİR

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Ferda HACIVELİOĞLU

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……/……/20… tarih ve ……/…… sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Not: Formdaki boşluklar mutlaka Ms Word ortamında doldurulacak.

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: İŞLENMEMİŞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN DOĞAL ANTİMİKROBİYALLERLE ENGELLENMESİ VE OLUŞAN BİYOFİLMİN ORTADAN KALDIRILMASI

YAZAR ADI : Tuğba KÖKÜMER

Bu tez çalışmasında, 50 çiğ süt örneğinden 20 tipik Stafilokok suşu izole edilerek tanımlandı. Tanımlanan bütün suşların vankomisine duyarlı olduğu, 6 suşun ise oksasiline duyarlı olduğu görüldü. Biyofilm oluşumu hem Kongo kırmızılı agar yöntemi ile hemde Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile belirlendi. Bütün suşların iki metodla da biyofilm oluşturdukları tespit edildi. Biyofilm oluşumun önlemesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için, 20 dakika süre ile sitrik asit (%2 ve 10) ve malik asit (%2 ve 10) uygulamaları, % 0.3 perasetik asit ve 200 ppm klor uygulamaları ile hem mikrotitrasyon plağında hemde paslanmaz çelik plakalarda karşılaştırılarak incelendi.

Biyofilm oluşumunun azaltılması (%) ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması (%) oranlarının, 20 dakika süre ile sitrik asit (%2 ve %10) ve malik asit (%2 ve %10) uygulamaları ile klor (200ppm) ve perasetik asit (%0.3) uygulamaları ile elde edilenden yaklaşık 1.5 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Bununla beraber, paslanmaz çelik plakalarda 20 dakika süre aynı organik asit uygulamaları ile hem biyofilm oluşumunun azaltılması (%) hem de oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması (%) oranlarının, klor (200ppm) ve perasetik asit (%0.3) uygulamaları ile elde edilen oranlardan çok daha fazla olduğu (2-2.5 kat) belirlendi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, süt sanayisine %2 veya % 10 konsantarsyonda 20 dakika süre ile sitrik ve malik asit uygulamasının biyofilm oluşumunun önlenmesinde ve ortadan kaldırılmasında pratik önemi olabileceğini göstermektedir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: INHIBITION AND REMOVAL OF BIOFILM FORMATION OF STAPHYLOCOCCUS STRAINS İSOLATED FROM RAW MİLK SAMPLES BY NATURAL ANTİMİCROBİALS

AUTHOR : Tuğba KÖKÜMER

In this study, 20 typical Staphylococcus strains were isolated and identified from 50 raw milk samples. All of the isolated strains were found to be sensitive to vancomycin and 6 strains were resistant to oxacillin. Biofilm formation of Staphylococcus strains was determined by both with Congo Red Agar and Microtitration plate method. All of the strains were confirmed as biofilm positive by two methods. The prevention and removal of biofilm formation of isolated Staphylococcus strains by citric acid (2% and 10%) and malic acid (2% and 10%) were investigated comperatively peracetic acid (0.3%) and chlorine (200 ppm) for 20 min both in 96 well microtitration plate and stainless steel coupons.

Inhibition and removal of biofilm formation rate (%) by citric acid and malic acid at concentration of %2 (w/v) and % 10 (w/v) for 20 min were about 1.5 times higher than those obtained by 200 ppm chlorine and 0.3% peroxide treatments in microtitration plates. However, in stainless steel coupons, inhibition and removal of biofilm formation rate (%) by the same organic acid treatments at the same concentrations for 20 min were about 2-2.5 times higher than those obtained by 200 ppm chlorine and 0.3% peroxide treatments. The results from this work provides a proof of concept that “natural antimicrobials” may be of subtantial practical importance for the prevention and removal of biofilm formation in dairy industry.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana danışmanlık yapan, hiçbir zaman desteğini ve anlayışını esirgemeyen, değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Meltem Yeşilçimen Akbaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda çalışmalarımı yaparken bana her türlü destek veren Büşra Özçelik, Taner Şar ve bana çalışmalarım sırasında yardımcı olan Uzman Hüseyin Balcı'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana maddi manevi her türlü destek veren sevgili annem Sema Erden ve babam Cezmi Erden'e yaptıkları tüm fedakarlıklar için, eşim Onur Kökümer'e gösterdiği sabır için teşekkür ederim. Ayrıca benden desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli iş arkadaşım Selma Büyük ve her aradığımda bana yardımcı olan arkadaşım Alper Kiraz'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET iv
SUMMARY v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Stafilokokların Genel Özellikleri 1
1.2. Biyofilm ve Yapısı 4
1.3. Biyofilm Oluşumu 6
1.4. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumu 7
1.5. Gıda Endüstrisinde *S. aureus*'ların Oluşturdukları Biyofilmlerin Önemi ve Yeri 9
1.6. Süt Sanayisinde Kullanılan Genel Dezenfeksiyon İşlemleri 11
1.7. Süt Ürünlerinde Dezenfektan Kalıntıları ve Neden Olabileceği Sorunlar 16
1.8. Tezin Amacı 17
2. GEREÇLER VE YÖNTEMLER 18
2.1. Gereçler 18
2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri 18
2.1.2. Kullanılan Cihazlar 18
2.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları 19
2.2. Yöntemler 19
2.2.1. Çiğ Sütten Stafilokok İzolasyonu 19
2.2.2. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Tanımlanması 19
2.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması 20
2.2.4. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması 21

2.2.4.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (Kalitatif Yöntem) 21
2.2.4.2. Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi (Kantitatif Yöntem) 21
2.2.5. Mikrotitrasyon Plağında Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi 22
2.2.6. Mikrotitrasyon Plağında Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması 23
2.2.7. Paslanmaz Çelik Plakalarda Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi 24
2.2.8. Paslanmaz Çelik Plakalarda Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması 25
2.2.9. İstatistiksel Analizler 26
3. BULGULAR 27
3.1. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri 27
3.2. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Oksasilin ve Vankomisin Antibiyotiklerine Karşı Dirençleri 29
3.3. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşturabilme Yetenekleri 31
3.4. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi ve Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması 32
3.4.1. Mikrotitrasyon Plağında Klor Uygulamaları 33
3.4.2. Çelik Plakalarda Klor Uygulamaları 34
3.4.3. Mikrotitrasyon Plağında Perasetik Asit Uygulamaları 36
3.4.4. Çelik Plakalarda Perasetik Asit Uygulamaları 38
3.4.5. Mikrotitrasyon Plağında Sitrik Asit Uygulamaları 40
3.4.6. Çelik Plakalarda Sitrik Asit Uygulamaları 43
3.4.7. Mikrotitrasyon Plağında Malik Asit Uygulamaları 45
3.4.8. Çelik Plakalarda Malik Asit Uygulamaları 47
4. TARTIŞMA ve SONUÇ 52
5. KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bla	Beta laktamaz
EPS	Ekstrasellüler polisakkarit
AHL	N-acylhomoserine laktonlar
AIP	Autoinducer protein
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
Bap	Biofilm associated protein
HOCl	Hipoklorik asit
THM	Trihalometan
PAA	Perasetik asit
CIP	Cleaning-in-place
TSB	Tryptic Soy Broth
µl	mikrolitre
ml	mililitre
kob	Koloni oluşturan birim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
3.1.	50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında klor (200 ppm), perasetik asit (0.03, v/v), sitrik asit (%2-10, w/v) ve malik asit (%2-10, w/v) ile biyofilm olşumunun en çok önlendiği (%) değerler ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırıldığı değerler	49
3.2.	50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda klor (200 ppm), perasetik asit (0.03, v/v), sitrik asit (%2-10, w/v) ve malik asit (%2-10, w/v) ile biyofilm olşumunun en çok önlendiği (%) değerler ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırıldığı değerler	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
1.1. Stafilokok türleri ve biyokimyasal özellikleri	2
3.1. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun biyokimyasal özellikleri	27
3.2. APIStaph testi uygulanarak belirlenen, 50 çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik, 4 atipik koloninin biyokimyasal özellikleri	28
3.3. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençleri	29
3.4. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun biyofilm oluşturabilme yetenekleri	30
3.5. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun klor (200 ppm) uygulaması ile önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin klor (200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılması (%)	32
3.6. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun klor (200 ppm) uygulaması ile önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin klor (200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılması (%)	34
3.7. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun perasetik asitle (%0.3, v/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin perasetik asitle (%0.3, v/v) ortadan kaldırılması (%)	35
3.8. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun perasetik asitle (%0.3, v/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin perasetik asitle (%0.3, v/v) ortadan kaldırılması (%)	37
3.9. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun sitrik asitle (%2 ve %10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin sitrik asitle (%2 ve %10, w/v) ortadan kaldırılması (%)	39

3.10. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun sitrik asitle (%2 ve %10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin sitrik asitle (%2 ve %10, w/v) ortadan kaldırılması (%) 41

3.11. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun malik asitle (%2 ve %10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin malik asitle (%2 ve %10, w/v) ortadan kaldırılması (%) 43

3.12. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun malik asitle (%2 ve %10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin malik asitle (%2 ve %10, w/v) ortadan kaldırılması (%) 45

1. GİRİŞ

1.1. Stafilokokların Genel Özellikleri

Stafilokoklar insan ve hayvanlar için fırsatçı patojen mikroorganizmalardır. Stafilokoklar *Micrococcaceae* familyası içinde 0.5-1.5 mm çapında, düzensiz kümeler halinde bulunan, tetrad, ikişerli kok ya da tek tek kok şeklinde görülen Gram pozitif bakterilerdir. Stafilokoklar, insanların ve çoğu sıcakkanlı hayvanların derisinde, ter bezi kanallarında, membranlarında ve vücudun farklı bölgelerinde (burun, cilt, boğaz) doğal olarak bulunmaktadırlar. Bu nedenle insanların ellerinden, öksürme, hapşırma gibi sebeplerle burun ve boğaz dokusundan süt ve süt ürünlerine bulaşma olasılıkları yüksektir. Özellikle mastitis hastalığı görülen hayvanlardan sağılan sütler, patojenik *S. aureus*'un önemli bir kaynağını oluşturmaktadırlar (Bilgehan, 2000).

S.aureus; pigmentli, fakültatif anaerob fakat genellikle aerob üreyen *(S. saccharolyticus ve S. aureus sbsp. anaerobius* hariç), koagulaz ve hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehaloz şekerlerini kullanabilme yetenekleriyle asit oluşturabilen, %10 (w/v) NaCl içeren ortamda ve 18–45˚C sıcaklık aralığında üreme gösterebilen, aflatoksin üretebilen, novobiosine duyarlı, lizozime direç gösterebilen, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteridir. Özellikle insan ve sıcakkanlı hayvanlarda gıda zehirlenmesine ve piyojenik enfeksiyonlara neden olmaktadır (Koneman ve ark., 1997; Cengiz ve ark.,1999; Bilgehan, 2000). *S. aureus;* gerek koloni morfolojisi gerekse enzimatik ve biyokimyasal özellikleri açısından diğer Stafilokok türlerinden ayırt edilebilmektedir (Çizelge 1.1). *S. aureus*'un pigmentleri karetenoid yapısında olup hücre zarında yer almaktadır. Aynı stafilokok türleri, farklı koşullarda değişik renkte pigment oluşturabilmektedir. *S. aureus;* ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır (Koneman ve ark., 1997; Cengiz ve ark.,1999).

Çizelge 1.1. Stafilokok türleri ve biyokimyasal özellikleri (Şahin, 2007)

Reaksiyon	*S. aureus*	*S.epidermidis*	*S. saprophyticus*	*S.intermedius*
Katalaz	+	+	+	+
Koagulaz	+	-	-	+
Clumping	+	-	-	D
Hemoliz	+	D	?	D
Mannitol Etki (Aerobik)	+	-	D	+
Mannitol Etki (Anaerobik)	+	-	-	-
Termonükleaz	+	-	-	+
Hiyalüronidaz	+	-	?	-
Protein A	+	-	?	D
Pigment	+	-	-	-
Dnaz	+	-	-	?

(+:pozitif, -: negatif, D: değişken ?:belirlenememiş)

Stafilokoklardaki başlıca sorun metisilin direncidir. Metisilin direnci çoğu kez kromozomal fakat bazen plazmit kaynaklı da olabilmektedir. Metisilin direnci, penisilinlere ve sefalosporinlerinlere karşı direnci ifade etmektedir. *S.aureus*, *mecA* geni aracılığı ile düşük afiniteli penisilin bağlayan beta laktam antibiyotiklere direnç göstermektedir. Bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda yaygın antibiyotik olarak vankomisin kullanılmaktadır. *Bla* (β-laktamaz) ve metisilin direncinde gerekli bir faktör olan *fem*, diğer metisiline direnç genleridir. Metisiline karşı gösterilen direnç çevre koşullarındaki değişikliklere göre de farklılık gösterebilmektedir (Lowy, 1998; Cengiz, 1999; Kloos ve Bonnermann, 1999; Şahin, 2007).

S.aureus suşlarının patojenitesi; adherans özellikleri, çesitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstrasellüler faktörler gibi özelliklerine bağlıdır. Ayrıca slime faktör üretmeleri ile biyofilm tabakası oluşturmaları da patojenite faktörlerinden en önemlileridir (Bilgehan, 2000).

Staphylococcus aureus ile kontamine olan gıdalarda tat, görünüm ve koku değişikliği meydana gelmemekle birlikte kontamine olmuş ürünler, insan sağlığı açısından önemli derecede risk oluşturmaktadırlar (Bilgehan, 2000).

Staphylococcus aureus, insanlara kontamine olmuş sütlerden bulaşabilmekte ve insanlarda özellikle mide bulantısı, abdominal kramplar ve ishal gibi rahatsızlıklara yol açmaktadır (Scherrer ve ark., 2004).

Çeşitli bakteriyel enfeksiyonların meydana gelmesi genellikle çiğ süt tüketimi ile bağlantılıdır. Çünkü süt, patojenik ve bozulmaya yol açan mikrorganizmalar için; bileşimleri, su aktiviteleri ve pH değerleri nedeniyle önemli bir besi ortamı oluşturmaktadırlar (Seifu ve ark., 2004).

Stafilokoklar, sıcak kanlı hayvanların vücut yüzeylerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu mikroorganizmaların neden oldukları hastalıklar septisemi, stafilokokkal gıda zehirlenmesi gibi akut enfeksiyonlardır. *S. aureus* formları özellikle enterotoksin ve agresinlerle hastalık yapmaktadırlar (Brock ve Madigan, 2006).

Stafilokok türlerinin gıdalara bulaşarak insanlarda hastalığa ve zehirlenmeye yol açma nedenleri; gıdalarda beslenme ortamı bulabilmelerine, gıda içerisindeki miktarlarına, rahatsızlanan kişinin direncine ve beslenme alışkanlıklarına, ortamın nem, ısı, ışık, oksijen ve pH şartlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Villard ve ark., 2005; Gülbandılar, 2006).

Stafilokok kökenli hastalıkların çeşitli ülkelerdeki rastlanma sıklığı, coğrafi koşullara ve yemek alışkanlıklarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bazı ülkelerde görülen stafilokok kaynaklı vakalardaki ölüm oranının düşük, klinik belirtilerinin ise hafif olarak nitelendirilmesine rağmen, en sık rastlanan gıda zehirlenmelerinden biri olduğu belirlenmiştir (Şahin, 2007).

1.2. Biyofilm ve Yapısı

Biyofilm, bir yüzey üzerinde temel birimini mikrokolonilerin oluşturduğu, mikrokoloniler tarafından üretilen ekstrasellüler polisakkaritler (EPS), proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabaka olarak tanımlanmaktadır (Watnick ve Kolter, 2000).

Biyofilmler, ekstraselüler polimerik maddeleri üreterek, planktonik canlılara göre değişmiş fenotip gösteren, yüzeye dönüşümsüz olarak bağlanabilen mikroorganizma topluluğudur. Bakterilere ilişkin yüzeydeki kolonizasyon ve biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalar oldukça fazla olmasına rağmen, mantar, maya, alg, protozoa ve virüsler de endüstriyel ve klinik alanda biyofilmlerden izole edilebilmektedirler (Webb ve ark., 2003).

Biyofilm tabakaları, mikroorganizmalar için koruyucu bir tabaka görevi görmektedirler. EPS, biyofilm oluşumun temelini oluşturmaktadır (Öner ve Ölmez, 2006). Biyofilm tabakası meydana getirebilen mikroorganizmalar, kendilerini dış etkenlerden EPS ile koruyabilmektedir (Koluman, 2006). Biyofilm tabakaları yüzeylerde ve bazı aşamalardan geçerek oluşmakta, bu oluşum çevresel ya da hücresel etkileşimlerden meydana gelebilmektedir (Lindsay ve Holy, 2006).

Biyofilm tabakasının mikrobiyal hücreler ve EPS ana iskeletinden oluştuğu bilinmektedir. EPS, toplam organik karbonun % 50 – % 90'lık kısmını içerisinde barındırarak ana maddeyi (matriks) oluşturmaktadır. EPS'nin kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik göstermesine rağmen öncelikli olarak polisakkaritlerden oluştuğu, bu polisakkaritlerden bir kısmının doğal, bir kısmının da anyonik yapıda olduğu ortaya konmuştur. Üronik asitlerin (D-glucuronic, D-galacturonik ve mannuronic asitler) bu yapıya anyonik özellik kattığı da tespit edilmiştir (Sutherland, 2001). Biyofilm tabakasındaki Gram pozitif bakterilerin varlığında EPS, katyonik yapı göstermekte olup ana yapısı teikoik asit ile proteinden oluşmaktadır (Hussain ve ark., 1993).

Biyofilmin; üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapı olduğu bildirilmiştir (Sutherland, 2001). Biyofilmde fiziksel ve biyolojik yapının çoklu iç ve dış faktörlerin etkileşimi ile düzenlendiği, fiziksel yapının EPS ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. EPS'nin jel ya da viskoelastik davranış sergileyebileceği, bu fazlara geçişinde protein, Ca^{+2} iyonları, polisakkaritler ile yapının daha sağlamlaştığı bildirilmiştir (Hussain ve ark., 1993; Leriche ve ark., 2000; Sutherland, 2001). Ayrıca yapılan çalışmalarda tabakalı yapının alttaki hücreleri stabilize ettiği, biyofilmde antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımı açısından değişkenlik gösteren tabakaların oluştuğu belirtilmiştir (Leriche ve ark., 2000; Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000).

Çoğu biyofilm yapısı birbirine benzer olsa da her bir biyofilmin yapısı kendine özgüdür (Tolker ve ark, 2000). Biyofilmin devamlılık gösteren tek bir tabakadan oluşmadığı ve daha çok mikrokolonilerden oluşan bir yapı olduğu tespit edilmiştir (Davison, 1999; Lagido ve ark., 2003). Ayrıca biyofilmde EPS dağılımının homojen olmadığı da belirlenmiştir. Sıvı akışı sonucu oluşan su kanallarının, heterojen besin maddesi, oksijen hatta antimikrobiyal madde dağılımına neden olduğu belirlenmiştir (James ve ark., 1995).

1.3.Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu başlıca beş evrede gerçekleşmektedir (Vuong ve Otto 2002; Post ve ark., 2004).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tutunmalarıyla başlayarak gerçekleşen bir olaydır. Tutunma işlemi ile birlikte biyofilm tabakasının meydana gelmesini sağlayan bir dizi genetik işlem başlatılır (Şahin, 2007). Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için öncelikle, bir yüzey ile ne zaman temas kurulması gerektiğini algılayabilmeleri gerekmektedir (Donlan, 2002; Şahin,2007). Bakteriler, yüzeye tutunabilmeleri için meydana gelen uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla düzenleyici bir sisteme sahiptir. Bu sistem, bir alıcı bir de verici molekülden oluşmaktadır.

Tutunma işlemini takiben, biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla farklılaşma işleminin başlaması, ‘‘quorum sensing’’ sistemi denilen başka bir haberleşme sistemine bağlı olarak devam etmektedir. “Yeterli çoğunluk” algılaması diye de isimlendirilen bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunmuş olan her bir bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılamaktadır. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları da artmaktadır. Böylece, sinyal moleküllerinin konsantrasyonundaki artışla birlikte biyofilm oluşumu başlamaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (Şahin, 2007). Bu haberci moleküller, Gram negatif bakterilerde; “AHL” (N-açilhomoserin laktonlar) olarak adlandırılan ve quarum sensing mekanizmasında en iyi karakterize edilen moleküllerdir (Ryan ve Dow, 2008). Bu moleküller serbest olarak hücre dışına sentezlenebilmektedir. Böylece, ortamda yüksek hücre konsantrasyonlarında AHL moleküllerinin miktarı da artar. Bu aşamadan sonra, AHL molekülleri bir indükleyici gibi iş görerek özel bir aktivatör proteinle birleşerek özel genlerin transkripsiyonunu harekete geçirir (Madigan ve Martinko, 2010)

Gram pozitif bakterilerde ise “autoinducer protein” adı verilen (AIP) haberci proteinler vardır. Gram pozitif bakteri gruplarındaki quarum sensing olayını düzenleyen bu moleküller, AHL moleküllerinden farklılık göstermektedir. AHL molekülleri, iç kısımdan dışarıya doğru diffüzyonla salınırken, AIP molekülleri hücre zarında bulunan bir sistem tarafından aktif olarak salgılanmaktadırlar (Raffa ve ark., 2005; Saraçlı, 2006).

İkinci evre, yapışma olayından oluşmaktadır. Bu olay, bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir.

Üçüncü evrede, bakteriler mikrokoloniler haline dönüşmektedirler. Dördüncü evrede ise, mikrokoloniler büyüyerek ve kompleks yapılara veya kulelere dönüşürler (Şahin, 2007).

En son olarak da, bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılmaktadır. Bu ayrılma evresinde gerçekleşen olaylar, dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşumun bir parçası olarak da tek bir hücrenin veya birçok hücrenin toplu şekilde kopmasıyla meydana gelebilmektedir (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2005; Şahin, 2007).

1.4.Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumu

Stafilokoklarda biyofilm oluşumu iki temel aşamadan oluşur.

Bakteriler ilk aşamada bir yüzeye yapışarak kolonize olurlar. Bu ilk aşamadaki kolonizasyon olayından ‘‘microbial surface components recognizing adhezive matrix molecules’’ (MSCRAMM) olarak adlandırılan değişik yüzey proteinleri sorumludur. Bu bakteriyel yüzey proteinleri, ekstrasellüler (fibronektin, fibrinojen, vitronektin, kollajen, elastin vb.) konak-doku ligandlarına bağlanarak yüzeylere olan yapışmanın başlamasında önemli bir rol oynamaktadır (Vancraeynest ve ark., 2004). Ayrıca, bu yüzey proteinlerinin çoğu, hücre duvarındaki peptidoglikanlara bağlanabilmektedirler (Foster ve Hook, 1998). İkinci aşamada, intersellüler adezyon

olarak da adlandırılabilen, hücre-hücre adezyonu olmakta, böylece biyofilm oluşumu meydana gelmektedir.

Stafilokoklarda biyofilm oluşumundan *ica*ADBC operonu ve ürünü olan ‘‘polysaccharide intercellular adhesin’’ (PIA) sorumlu tutulmaktadır (Cramton ve ark., 1999). *Ica*ADBC operonu ilk kez *S.epidermidis*’te bulunmuştur. Bununla birlikte, aynı operonun, *S.aureus*’ta da bulunduğu ve benzer fonksiyonlar gösterdiği bildirilmiştir. *S.aureus* ve *S.epidermis’*in biyofilm oluşturmasında *icaA* ve *icaD* genleri daha önemli bulunmuştur (Patti ve ark., 1994; Şahin, 2007). Çeşitli bakteri türlerinin biyofilm oluşumunda yapısal bir grup yüzey proteinlerinin de önemli olduğu görülmüştür. Bu grubunda ilk üyesi olarak mastitli sığırdan izole edilen bir *S.aureus* suşu’ndaki (*S.aureus* V329) ‘‘biofilm associated protein’’ (bap)’in biyofilm oluşumu için gerekli yapılardan birisi olduğu bildirilmiştir. *Bap* genine sahip *S.aureus* suşlarının daha güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir (Lasa ve Penades, 2006).

Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler vardır. İç faktörleri su aktivitesi, besin maddelerinden faydalanma durumu, antimikrobiyal madde içeriği, pH değeri, oksijen ihtiyacı gibi durumlar oluşturur. Dış faktörler ise, yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı ve sınırlı besin maddesidir (Douglas, 2003).

Bakteriler birçok yüzeye tutunabilmekte ve biyofilm oluşturabilmektedir. Bunun sonucunda tıp ve endüstride biyofilmden kaynaklanan birçok problem yaşanmaktadır (Brooks ve Flint, 2008). Bu problemler arasında, ürünlerin gıda işletmesinde meydana gelen biyofilm bakterileri ile bulaşmasının ürünlerin raf ömrünü kısaltacağı ve bunun yanı sıra gıda patojenleri ile insan sağlığını tehlikeye sokacağı bildirilmiştir (Reinemann ve ark., 1993).

1.5. Gıda Endüstrisinde *S. aureus'ların* Oluşturdukları Biyofilmlerin Önemi ve Yeri

Bakteriler biyofilm yapısında bulundukları zaman çeşitli antimikrobiyallere karşı dirençli durumdadırlar. Biyofilmin bu koruma etkisi hastalıklarda ve başta gıda sanayi olmak üzere birçok alanda önemli sorunlar oluşturmaktadır. Son yıllarda daha uzun üretim periyotları, kompleks ekipman kullanımı, mikrobiyolojik standartların daha düzenli bir şekilde uygulanıyor olması biyofilm konusunu ön plana çıkarmıştır (Öner ve Ölmez, 2006).

Gıda endüstrisinde, özellikle süt ve süt ürünlerinde kontaminasyonun ana kaynağı olarak ekipmanların temizliği ve dezenfeksiyonu gösterilmektedir. Buradaki en önemli sorun, inorganik bileşiklerden oluşan tortunun ve mikrofloranın ekipmanlardan sterilizasyon işlemleri ile uzaklaştırılamamasıdır. Süt biyofilmlerinde genellikle EPS ve süt kalıntıları, çoğu proteinler ve kalsiyum fosfat baskındır. Süt endüstrisinde, biyofilm oluşumu, ekipmanlarda bir dizi hijyen problemine, gıdaların bozulmasına ve ekipmanların zarar görmesine neden olarak ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Bremer ve ark., 2006; Gram ve ark., 2007). Özellikle biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar kimyasal ve biyolojik reaksiyonları katalizleyerek boru hatlarında ve tanklardaki metalin korozyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca biyofilm tabakası, ısıtıcılarda ve boru hatlarında kalın bir tabaka oluşturduğundan, ısı transferi etkinliğinin indirgenmesine de sebep olabilmektedir (Simoes ve ark., 2010).

Yapılan bir çok çalışmada, gıda ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini etkileyen, gıda ile temas eden yüzeyler ve biyofilmlerde bazı gıda kaynaklı patojenlerin bulunduğunu tespit edilmiştir. Genellikle biyofilm ile ilişkili patojenlerin salgınları *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Salmonella spp.* ve *Escherchia coli* O 157:H7 varlığı ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Kumar ve Anand,1998; Sharma ve Anand, 2002a; Dykes ve ark., 2003; Lapidot ve ark., 2006; Aarnela ve ark., 2007).

Gıda kaynaklı patojenler; süt üretim ekipmanlarına, mandıra ortamındaki patojenlerle direkt temastan veya süt makinaları için kullanılan su ile girebilmektedir. (Oliver ve ark., 2005).

Süt ürünlerinin pastörizasyon sonrası kontaminasyonu, dolum makinalarından kaynaklanmaktadır (Waak ve ark., 2002; Dogan ve Boor, 2003). Dolum makinalarında conta tarafında gelişen biyofilmler pastörizasyon sonrası kontaminasyona sebep olabilmektedir (Holah, 1992; Gibson ve ark., 1999). İstenmeyen biyofilmlerin etkili kontrolünde, ortamdaki organik maddelerin özelliğinin (karbonhidratlar, yağ, proteinler, mineral tuzlar) bilinmesi mikroorganizmaların yüzeylerden uzaklaştırılmasında önemlidir. Bu nedenle, mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve etkili bir dezenfeksiyon işlemi uygulanmalıdır. Dezenfeksiyon işlemi sırasında kullanılacak olan deterjan ve dezenfektan seçimi, özellikle kimyasal işlemler sonrasında, gıda ürünlerinin üzerinde oluşabilecek duyusal etkileri nedeni ile de değişkenlik gösterebilmektedir (Mosteller ve Bishop, 1993; Wirtanen ve ark., 2000). Ayrıca ekipmanların dizaynı ve yüzey materyallerinin seçimi de biyofilm oluşumunun önlenmesinde önemli bir faktördür.

Mekanik taşlama, fırçalama, elektrolitik veya mekanik parlatma ile biyofilm tabakasının uzaklaştırılabildiği en pratik üretim ekipmanı maddesi çeliktir (Maukonen ve ark., 2003). Etkili bir sanitasyon programı için ön koşul, işleme ekipmanlarının yüksek hijyen standartları ile dizayn edilmiş olmasıdır. Köşeler, çatlaklar, yarıklar, conta, vana ve eklemler biofilm tabakaları için hassas noktaları oluşturur (Chmielewski ve Frank, 2006; Simoes ve ark., 2010). Başka bir deyişle, biyofilm tabakası oluşturabilen bakteriler bu tip yüzeylerde kendilerine tutunacak alan bulmakta zorlanmazlar ve burada kolayca çoğalabilirler (Simoes ve ark., 2010).

Süt sanayinde, bakteri kontaminasyonu kaliteyi ve üretilen ürünün güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Ürünlerin biyofilm bakterileri ile bulaşmasının raf ömrünü kısaltacağı, gıda patojenleri ile de insan sağlığını tehlikeye sokacağı da bildirilmiştir (Reinermann ve ark., 1993). Bunun yanında, karışık türlerin

oluşturduğu biyofilmlerin tek türden oluşan biyofilmlere göre daha kararlı oldukları belirlenmiştir (Brooks ve Flint, 2008).

1.6. Süt Sanayisinde Kullanılan Genel Dezenfeksiyon İşlemleri

Süt sanayisinde, temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri, klasik süt ürünleri üretiminin önemli bir parçasıdır. Bu dezenfeksiyon işlemleri kontrolsüz uygulandığı taktirde, son ürünün kalitesi etkilenmektedir (Bremer ve ark., 2006). Genellikle dezenfektanlar, etkisiz bir temizlik işleminden sonra, bir yüzey üzerine bırakılan biyofilm yapısına nüfuz etmez ve böylece biyofilmdeki canlı hücreler yok edilemez (Simoes ve ark., 2006). Bu yüzden, dezenfeksiyon işlemi için kullanılacak olan ekipmanın seçimi, bu işlemini iyileştirmek için birinci adım olmakta ve büyük önem taşımaktadır. Ekipman üzerinde gerçekleştirilen dezenfeksiyon işlemi, yiyecek artıkları ve mikroorganizma içeren veya mikrobiyal büyümeyi teşvik edebilen diğer kalıntıları ortamdan uzaklaştırmak açısından önem taşımaktadır. Yüksek sıcaklık kullanımı, su türbülans ve fırçalama gibi fiziksel kuvvetler uygulama ihtiyacını azaltır (Maukonen ve ark., 2003). Genellikle dezenfeksiyon işlemi için kullanılan kimyasallar, artıkları, emülsiyon yağları ve proteinleri denatüre ederek askıya almak ve yok etmek için kullanılmaktadır.

Süt işleme tesislerinde, yüzeyler için kullanılan asitli dezenfektanlar, yüksek mineral içeriğine sahip yiyecek artıkları içeren kirlilik getirmektedir. Mekanik işlemler, biyofilmlerin giderilmesinde son derece etkili olarak kabul edilmektedir. Dezenfektanlar canlı hücreye erişerek etkili bir dezenfeksiyon prosedürü ile biyofilmin ilişkili olduğu EPS'nin yapısına etki ederek bozulmasını sağlamaktadır (Simoes ve ark., 2006). Dezenfeksiyon işlemi sırasında, yüzey ile ilişkili olan mikroorganizmaların %90 veya daha fazlasını azaltabilmesine rağmen, mikroorganizmaların tamamen ortadan kaldırılması açısından bir kesinlik söz konusu olmamaktadır. Mikroorganizmalar, farklı yerlere, belirli sürelerde yeniden tutunabilmekte, su ve besinle birlikte yeni bir biyofilm tabakası oluşturabilmektedirler (Gram ve ark., 2007).

Bilindiği gibi, dezenfeksiyon işlemi, mikroorganizmaları büyük ölçüde ortadan kaldırmak için antimikrobiyal ürünlerin kullanılmasıdır. Dezenfeksiyon işleminin amacı; işlem tamamlandıktan sonra, kalan canlı hücrelerin yüzeyindeki nüfusu azaltmak ve üretim öncesinde yüzeyler üzerindeki mikrobiyal büyümeyi önlemektir. Dezenfektanlar, organik madde yokluğunda (yağ, karbonhidrat ve protein) daha etkili olmaktadırlar. Genellikle dezenfektan etkinliğinin kontrolünde; organik maddelerle etkileşim, pH, sıcaklık, su sertliği, kimyasal inhibitörler, konsantrasyon ve temas süresi önem taşımaktadır (Cloete ve ark., 1998; Bremer ve ark., 2002; Kuda ve ark., 2008). Dezenfektanlar; etkili, güvenli, kullanımı kolay olmalı ve hiçbir toksik kalıntı bırakmadan yüzeylerden durulanabilir olmalıdır. Dezenfektan kalıntıları, insan sağlığı ve son ürünlerin duyusal özelliklerini etkilemeleri açısından büyük önem teşkil etmektedir (Simoes ve ark., 2010).

Günümüzde, gıda işletmelerinde kullanılan dezenfektanlar arasında, halojenler, yüzey aktif maddeler, alkoller, asitler, alkaliler, oksidan maddeler, fenol ve fenolik bileşikler yer almaktadır (Evans, 2000).

Klor, farklı bileşik formları halinde, gıda işletmelerinde, en sık kullanılan dezenfektanlardan biridir. Yaygın olarak kullanılan klor bileşikleri, sıvı klor ve hipokloritler ile kloraminler ve organik kloraminlerini kapsamaktadır.

Hipoklorik asit (HOCl), klor tabanlı dezenfektanlar arasında kullanılan en aktif formu oluşturmaktadır. Dezenfeksiyon işlemi için kullanılacak olan en uygun klor bileşiğinin fonksiyonu, bileşiğin pH değeri ile ilgili olarak değişiklik gösterebilmektedir. pH 5’te iken hemen hemen tüm klor bileşikleri HOCl formunda bulunmaktadır. pH 7’de ise bileşiğin yaklaşık %75’i HOCl formundadır (Schmidt, 2012).

Dezenfeksiyon işlemi sonrasında eğer durulama yapılmayacaksa, izin verilen maksimum düzey 200 ppm konsantrasyondaki klor uygulamasıdır. Fakat zaman zaman önerilen kullanım düzeyleri değişiklik gösterebilmektedir (Schmidt, 2012).

Hipokloritlerin, 50 ppm konsantrasyonda en az 1dakika süre ile ve 24°C sıcaklıkta dezenfektan olarak kullanılması önerilmektedir. Her 10°C'lik sıcaklık düşüşünde, muamele süresinin iki katına çıkarılarak kullanılması tavsiye edilir. Kloraminin ise, 1 dakika süre ile 200 ppm konsantrasyonda dezenfekte edilecek olan yüzeylere uygulanması gerektiği belirtilmektedir (Schmidt, 2012).

Klor bileşikleri, glukoz metabolizmasında rol alan hücresel enzimleri inhibe eden, DNA üzerinde öldürücü bir etkiye sahip olabilen ve hücresel proteinleri okside edebilen bileşiklerdir.

Klor, düşük sıcaklıkta yüksek aktiviteye sahip, nispeten ucuz ve yüzeyler üzerinde minimal kalıntı veya tabaka bırakan bileşiklerin başında geldiğinden yaygın olarak kullanılan bir dezenfektandır (Schmidt, 2012).

Klor aktivitesi pH ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenir. Bununla birlikte, klor diğer bileşiklere (özellikle de dörtlü amonyum bileşikleri) kıyasla su sertliğinden daha az etkilenmektedir (Schmidt, 2012).

Klor bileşiklerinin avantajları olduğu kadar dezanvajları da vardır. Dezavantajlarının arasında en önemlisi ise, özellikle yüksek sıcaklıklarda birçok metal yüzeyde oldukça aşındırıcı bir etkiye sahip olmasıdır. Ayrıca sağlık ve iş güvenliği açısından da ciddi sorunlarla karşılaşılabilmektedir. Örneğin, ciltte tahriş ve mukozada hasar oluşabilir, düşük pH'larda ölümcül Cl_2 (hardal gazı) oluşabilmektedir. Ayrıca kanserojen trihalometanlar (THM)'ın oluşumuna sebep olur (Schmidt, 2012).

Bir dezenfektan olarak klor, tüm bu risklerin yanında, alternatif dezenfektanların bulunmaması nedeniyle halen özellikle gıda işletmelerinde kullanılmaktadır (Schmidt, 2012).

Perasetik Asit (PAA)'in ise uzun süreden beri antiseptik bir özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Ancak, son yıllarda gıda sektöründe yeni yeni uygulanma alanı

bulmuş ve klor bileşiklerine alternatif bir dezenfektan olarak kullanılmaya başlanmıştır.

PAA'in dezenfektan olarak kullanılma konsantrasyonu genellikle 100 ppm ile 200 ppm'dir.

Perasetik asitin gıda işletmelerinde dezenfektan olarak kullanılmasının sebepleri arasında içeriğinde fosfor bulunmaması, köpürmemesi ve aşındırıcı özelliğinin oldukça az olması yer almaktadır. Ayrıca PAA çözeltileri, biyofilmlerin yüzeylerden uzaklaştırılması açısından da oldukça etkili dezenfektanlardır.

Bu dezenfektanın etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemesine rağmen genellikle mikroorganizmalar üzerinde hidrojen peroksit ile benzer etkilere sebep olduğu düşünülmektedir. PAA'in, Gram-pozitifnve Gram-negatif mikroorganizmalara karşı oldukça aktif olduğu tespit edilmiştir. PAA'in antiseptik aktivitesi pH değişiminden etkilenebilmektedir. Örneğin; herhangi bir pH atışı, bu dezenfektanın etkinliğini büyük ölçüde azaltır. Ayrıca, PAA, %40 gibi bir konsantrasyona sahip olduğunda oldukça toksik ve tahriş edici bir özelliğe sahip olabildiğinden dikkatli kullanılması gerekmektedir (Schmidt, 2012).

Süt ve süt ürünleri üreten işletmelerde biyofilm oluşumunu tamamen ortadan kaldırmak için genel olarak kostik (sodyum hidroksit) ve asit (nitrik asit) gibi kimyasal çözücülerle yıkama işlemleri yapılarak, organik ve inorganik artıklar uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu uygulamalarla bakterilerin uzaklaştırılmasının tam olarak sağlanamadığı yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Austin ve Bergeron, 1995; Faille ve ark., 2001). Özellikle *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlerle kontamine gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı bakımından da büyük sorun olduğu bilinmektedir (Watnick ve Kolter, 2000). Bu nedenle, daha hızlı etki eden ve bilinmeyen yan ürünler üretmeyen güvenli yeni dezenfektanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Gıda sanayinde kullanılacak alternatif ideal bir dezenfektanın; geniş bir antimikrobiyal etkinliğinin olması, toksik olmaması, irritasyon yaratmaması, dezenfeksiyon yüzeyi ile uyuşması, hazırlanması ve kullanımı kolay olması, kararlı, ucuz ve kolay temin edilebilir olması, kötü kokmaması gerekmektedir (Bilgehan, 2000).

Gıda ürünlerinin patojen ve saprofit mikroorganizmalar ile bulaşma riskini azaltmak için üretim sırasında ve sonrasında düzenli olarak temizlik ve dezenfeksiyon işlemi yapılması gerekmektedir. Özellikle süt üretiminde kullanılan alet ve ekipmanların son durulaması ve suyun süzülmesi işlemlerinin yetersiz yapılması durumunda deterjan ve dezenfektan kalıntılarının süt ürünlerine bulaşabilme olasılığı daha da artmaktadır. Bu olasılık da başta üretim basamakları olmak üzere insan sağlığını da etkilemektedir.

Süt ürünleri üretim hatlarında genellikle CIP (Cleaning-in-place) olarak isimlendirilen bir işlem uygulanmaktadır. Buna göre işlem basamakları aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmektedir:

1. Genel artıkları çıkarmak için ön yıkama

2. Kalan küçük artıkları çıkarmak için deterjan ile sirkülasyon

3. Deterjanı temizlemek için soğuk su ile durulama

4. Dezenfektanı inaktive etmek ve kalan mikroorganizmaları öldürmek için sirkülasyon

5. Son olarak deterjanın dışarı atılması için soğuk su ile durulama (Forsythe and Hayes, 1998)

Bununla birlikte, CIP prosedürlerine rağmen, yüzeyler üzerinde kalan mikroorganizmaların yol açtığı biyofilm oluşumlarına sıklıkla rastlanabilmektedir (Kumar ve Anand, 1998; Bremer ve ark., 2006).

1.7. Süt Ürünlerinde Dezenfektan Kalıntıları ve Neden Olabileceği Sorunlar

Süt ürünlerine dezenfektan bulaşması, dezenfeksiyon işleminden sonra iyi bir durulama yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Buradaki kalıntı ve bulaşma miktarı; ekipman yüzeyinde bulunan dezenfektan konsantrasyonu ve miktarı, kullanılan durulama suyunun miktarı, ekipman yüzeyinin yapısı, dezenfektanın durulanabilme özelliği ve tesisat çıkışındaki akış hızına bağlı olarak değişebilmektedir (Orth, 1998; Karagözlü ve Karagözlü, 2004)

Dezenfektanların ürünlere bulaşmasının asıl sebebi son durulama işleminin yetersiz yapılması ile dezenfektan kalıntılarının ekipman yüzeylerine absorbsiyonundan kaynaklanmaktadır.

Süt ürünlerine çeşitli sebeplerden dolayı dezenfektan bulaşmasının sebep olabileceği bazı sorunlar da söz konusu olmaktadır. Bunların başında öncelikle sağlık açısından meydana gelebilecek olan sorunlar gelmektedir. Genellikle süt işletmelerinde dezenfektan olarak kullanılan ve kalıntı bırakabilen maddelerin de genellikle insan sağlığını tehdit etmediği tespit edilmiştir. Fakat bu şekilde kontamine olmuş bir ürünün uzun süreli kullanımından kaynaklanacak olan sonuçlar da tam olarak bilinmemektedir. Dezenfektanlardan kaynaklanabilen kontaminasyon duyusal olarak ve kültürlerin aktivitelerini inhibe etme ihtimalleri ile teknolojik açıdan da sorun teşkil edebilmektedir (Karagözlü ve Karagözlü, 2004)

1.8. Tezin Amacı

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, işlenmemiş sütlerden izole edilen Stafilokok suşlarının, biyofilm oluşturma özelliklerinin, bu çalışmada kullanılacak olan yeni ve doğal antimikrobiyal maddelerle engellenmesi incelenmemiştir.

Bugün klasik antimikrobiyal ajanların dışında daha etkili, doğal ve güvenilir antimikrobiyallere acilen gereksinim vardır. Bu nedenle bu tez çalışmasında; çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilokok suşlarının tanımlanması, biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi, biyofilm oluşumunun doğal antimikrobiyallerle engellenmesi ve oluşan biyofilmlerin doğal antimikrobiyallerle ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerinden Baird-Parker Medium Agar Base (CM0275) ve Staphytect Plus (DR 0850M) Oxoid, Hants, U.K'dan, Egg Yolk Tellurite Emulsion (SR0054C) ve Nutrient Agar (CM 0003) ise Oxoid, Hampshire, İngiltere'den sağlandı. Peptone Water, hidrojen peroksit, DNase Test Agar, Tryptic Soy Broth, Oksasilin, Vankomisin, Agar, Brain Heart Infuzion Broth, Muller Hinton Agar ile perasetik asit ve aktif klor, Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edildi. Kongo kırmızısı ile Sükroz ise Sigma Aldrich, USA'den temin edildi. API Staph ve Kristal Viole, BIOMERIEUX, L'Etoile, Fransa'dan; kitosan, Sepe Natural, İzmir, Türkiye'den; malik asit ile sitrik asit ise Selen Biokimya, İstanbul, Türkiye'den sağlandı. 96 kuyulu mikrotitrasyon plakları ise TPP, Missouri, U.S.A'den temin edildi. Çelik plakalar ise 20 x 40 x 1 mm ebatında ÖZBİR A.Ş., Sakarya, Türkiye'de hazırlandı.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında hücrelerin üretilebilmesi ve Kongo kırmızılı agarda biyofilm oluşumunun gözlenebilmesi için, Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya inkübatörü kullanıldı. Biyofilm oluşumunun incelenebilmesi için 570 nm'deki absorbans değerleri, bir ELISA cihazı (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) ile ölçüldü (Carneiro ve ark., 2011). Çalışmalarda kullanılan tüm sarf malzemeler ve diğer malzemeler ise deneylerden önce Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya otoklavı kullanılarak steril edildi.

2.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu çalışmada, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olan *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı (Sandberg ve ark., 2008). Bu çalışmada, bu suş, çiğ sütlerden izole edilen Stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin incelenmesi açısından karşılaştırma amacıyla kullanıldı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Çiğ Sütten Stafilokok İzolasyonu

Çiğ sütlerden izole edilen suşların tanımlanması FDA, 2001 (U.S Food and Drug Administration) metoduna göre yapıldı. Bunun için 5 farklı süt işletmesinden toplanan 50 çiğ süt örneğinden ayrı ayrı 25 ml alınarak, bu süt örnekleri 225 ml %0.1 (w/v) konsantrasyonda peptonlu su ile stomacher torbalarında 2-3 dakika süre ile karıştırıldı. Elde edilen homojenatlardan Baird Parker Agar Medium'a (Oxoid, Hants, U.K) 0.1 ml inokule edilip drigalski spatülü ile yayılarak hazırlanan petrilerdeki homojenatlar 37˚C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda şeffaf zonlu olan (tipik) ya da olmayan (atipik) siyah koloniler identifikasyon için Nutrient Agar'a çizgi ekim yapılarak 37˚C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edildi (Sandberg ve ark., 2008).

2.2.2. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Tanımlanması

Kolonilerin tanımlanması için; koagulaz testi, katalaz testi, APIStaph biyokimyasal doğrulama testi, DNAaz testi ve oksasilin ile vankomisin antibiyotiklerine karşı direnç testleri uygulandı.

Koagulaz testi için Nutrient Agar'da üreyen kolonilerden alınarak Staphytect Plus (Oxoid, Hants, U.K), Oxoid test kiti tablasına aktarıldı. Üzerine test kiti içerisindeki aglütinasyon solüsyonundan damlatıldı ve çökelme olup olmadığına bakıldı. Çökelme olması ile bu koloniler koagulaz pozitif olarak değerlendirildi.

Katalaz testi için ise %3 (w/v) konsantrasyonda hidrojen peroksit lam üzerine damlatıldı ve Nutrient Agar besiyerinde üremiş olan saf kültür kolonilerinin her birinden alınarak hidrojen peroksit ile süspanse edildi. Süspansiyonda kabarcık oluşması ile bu koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

İzole edilmiş olan kolonilere ayrı ayrı APIStaph biyokimyasal doğrulama testi (Biomerieux, L'Etoile, Fransa) uygulandı. Bu doğrulama testiyle izole edilen bakterilerin, glukoz, fruktoz, mannoz, maltoz, laktoz, trehaloz, mannitol, ksilitol, melibioz, rafinoz, ksiloz, sükroz, metil-α-D-glukopiranozid ve N-asetil-glukozamin gibi şekerleri kullanma yetenekleri araştırıldı. Ayrıca nitratı indirgeyebilme ve alkalin fosfataz ile asetil-metil-karbinol üretme yetenekleri de incelendi. Bu test sonucunda elde edilen veriler API WEB programına girilerek bakterilerin türleri tespit edildi. Ayıca DNaz testi de uygulanarak kolonilerin doğrulanması sağlandı. Bu test, izole edilen suşlardan DNase Test Agara çizgi ekim tekniği ile ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler, 35˚C sıcaklıktaki inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda şeffaf zonlu kolonilerin bulunduğu petriler DNAz pozitif olarak değerlendirildi. Tüm suşların oksasilin ve vankomisine karşı duyarlılıkları Muller Hinton Agar besiyerinde "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)" tarafından önerilen disk difüzyon testi yöntemiyle belirlendi.

2.2.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

%2 (w/v) glikoz içeren TSB (Tryptic Soy Broth) için; 30 g Tryptic Soy Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) tartılarak 800 ml distile su ilave edildi ve manyetik bir karıştırıcıda karıştırıldı. Ayrıca 20 g glikozun 200 ml distile su içerisinde karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Her iki karışım da otoklavda (Hirayama

Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ayrı ayrı steril edildi. Steril edildikten sonra yaklaşık 50˚C sıcaklığa soğuması beklenerek bir araya getirildi.

2.2.4. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

2.2.4.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (Kalitatif Yöntem)

Kongo kırmızılı agar besiyeri litrede 10 g agar (Merck, Darmstadt, Almanya), 50 g sükroz (Sigma Aldrich, USA), 37 g Brain Heart Infuzion Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 0.8 g Kongo kırmızısı (Sigma Aldrich, USA) içerecek şekilde hazırlandı ve otoklavlanarak petrilere döküldü (Freeman ve ark., 1989). Bu besiyerlerine, izole edilen suşlardan çizgi ekimleri yapıldı ve 37°C sıcaklıkta 24 saat, daha sonra da 25°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi. Besiyerinde kırmızımsı siyah, pürüzlü, kuru, şeffaf koloniler biyofilm (slime) pozitif, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu koloniler, biyofilm negatif olarak değerlendirildi (Jain ve Agarwal, 2009).

2.2.4.2. Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi (Kantitatif Yöntem)

İzole edilen Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5 x 10^8 kob/ml), içerisinde % 0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik tuzlu su bulunan tüplerde süspansiyonlar hazırlandı. Daha sonra %2 (w/v) glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) bulunan tüplere, hazırlanmış olan süspansiyonlardan 0.1 ml alınarak 37°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir tüpten 150 µl alınarak iki tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu polistren mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Bu plakalar, 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, sıvı besiyeri dökülüp, kuyucuklar distile suyla bir piset yardımı ile 3 kez nazikçe yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra, kuyucuklara %0.5 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan kristal viyole solüsyonunun 150 µl'si dağıtılarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma

kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara, 150 µl etanol:asetik asit (95:5) ilave edilip 10 dakika süre ile bekletilerek boyanın çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra, her kuyucuktan 100 µl alınarak yeni bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 570 nm olan filtre ile ELISA (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) okuyucuda okutuldu. Her suş iki farklı kuyucukta tekrarlı bir şekilde çalışıldı. Sonuçlar, negatif kontrol (sadece besiyeri) ve pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan *S.aureus* ATCC 25923 ile inkübe edilen kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi (Şahin, 2007; Sandberg ve ark., 2008).

2.2.5. Mikrotitrasyon Plağında Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi

Mikrotitrasyon plağı kuyucukları, 100 µl %2 (w/v) ve %10 (w/v) konsantrasyonlarda ve 20 dakika süre ile doğal antimikrobiyal olan kitosan, sitrik asit ve malik asit ile süt işletmelerinde dezenfektan olarak sıklıkla kullanılan %0.3 (v/v) konsantrasyonda perasetik asit ve 200 ppm konsantrasyonda aktif klor (5 dakika) ile muamele edildi. Daha sonra içerisinde sitrik asit ve malik asit ile perasetik asit bulunan kuyucuklar yıkanmadan, içerisinde klor bulunan kuyucuklar ise yine süt işletmelerinde uygulandığı gibi 6 kez yıkanarak kurutuldu. İzole edilen Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1,5 x 10^8 kob/ml), içerisinde % 0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik tuzlu su bulunan süspansiyonlar hazırlandı. Daha sonra %2 (w/v) glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) içeren tüplere, hazırlanmış olan süspansiyonlardan 0.1 ml alınarak 37°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir tüpten 150 µl alınarak iki tekrarlı olacak şekilde, öncesinde 100 µl %2 (w/v) ve %10 (w/v) konsantrasyonlarda ve 20 dakika süre ile doğal antimikrobiyal olan sitrik asit ve malik asit ile süt işletmelerinde dezenfektan olarak sıklıkla kullanılan %0.3 (v/v)'lük perasetik asit ve 200 ppm konsantrasyonda aktif klor (5 dakika) muamele edilmiş olan 96 kuyulu polistren mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Bu plakalar 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, sıvı besiyeri dökülüp, kuyucuklar distile suyla bir piset yardımı ile 3 kez nazikçe yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra, kuyucuklara %0.5 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan kristal

viyole solüsyonunun 150 µl'si dağıtılarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara, 150 µl etanol:asetik asit (95:5) ilave edilip 10 dakika süre ile bekletilerek boyanın çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra, her kuyucuktan 100 µl alınarak yeni bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 570 nm olan filtre ile ELISA (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) okuyucuda okutuldu. Her suş iki farklı kuyucukta tekrarlı bir şekilde çalışıldı. Sonuçlar, negatif kontrol (sadece besiyeri) ve pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan *S.aureus* ATCC 25923 suşu ile inkübe edilen kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi (Şahin, 2007; Sandberg ve ark., 2008). Antimikrobiyallerin ve işletmelerde kullanılan dezenfektanların biyofilm oluşumunu engelleyici etkileri, biyofilm oluşumunun azalma oranlarına (%) göre belirlendi.

2.2.6. Mikrotitrasyon Plağında Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması

İzole edilen Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5 x 10^8 kob/ml), içerisinde % 0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik tuzlu su bulunan tüplere süspansiyonlar hazırlandı. %2 (w/v) glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) bulunan tüplere, hazırlanmış olan süspansiyonlardan 0.1 ml alınarak 37°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir tüpten 150 µl alınarak iki tekrarlı ve her bir uygulama için ayrı olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kuyucuklarına aktarıldı. Bu plakalar 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, sıvı besiyeri dökülüp, kuyucuklar distile suyla 3 kez bir piset yardımı ile nazikçe yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra, % 2 (w/v) ve % 10 (w/v) konsantrasyonda ayrı ayrı hazırlanan sitrik asit, malik asit ve % 0.3 (v/v) konsantrasyonda perasetik asit ile 20 dakika, 200 ppm konsantrasyonda hazırlanan aktif klor ile süt işletmelerinde uygulandığı gibi 5 dakika süre ile muamele edildikten sonra kuyucuklar ters çevrildi. Sitrik asit, kitosan, malik asit ve perasetik asit ile muamele edilen kuyucuklarda

durulama işlemi yapılmadan kuyucuklar kurumaya bırakıldı. Ancak 200 ppm konsantrasyonda aktif klor muamelesinden sonra kuyucuklar süt işletmelerinde uygulandığı gibi 6 kez yıkanarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra, kuyucukların her birine %0.5 (v/v) konsantrasyonda kristal viyole solüsyonunun 150 µl'si dağıtılarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara 150 µl etanol:asetik asit (95:5) ilave edilerek ve 10 dakika bekletilerek boyanın çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra, her kuyucuktan 100 µl alınarak yeni bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 570 nm olan filtre ile ELISA (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) okuyucuda okutuldu. Her suş iki farklı kuyucukta tekrarlı bir şekilde çalışıldı. Sonuçlar, negatif kontrol (sadece besiyeri) ve pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan *S.aureus* ATCC 25923 suşu ile inkübe edilen kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi (Şahin, 2007; Sandberg ve ark., 2008).

2.2.7. Paslanmaz Çelik Plakalarda Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi

20 x 40 x 1 mm'lik paslanmaz çelik plakalar % 2 (w/v) ve % 10 (w/v) konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan sitrik asit, malik asit ve % 0.3 (v/v) konsantrasyonda perasetik asit ile 20 dakika, 200 ppm konsantrasyonda hazırlanan aktif klor, 5 dakika süre ile muamele edilerek (aktif klorla muamele edilmiş plakalar süt işletmelerinde uygulandığı gibi 6 kez yıkandıktan sonra) içerisinde 20 ml %2 (w/v) konsantrasyonda glikoz içeren kültür ortamı bulunan cam kavanozların içerisine yerleştirildi. İzole edilen Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5 x 10^8 kob/ml), içerisinde % 0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik tuzlu su bulunan süspansiyonlardan 0.22 ml alınarak kültür ortamı içeren cam kavanozların içerisine inoküle edilerek 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonrasında paslanmaz çelik plakalar distile su ile piset yardımıyla yıkanarak %0.5 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan kristal viyole solüsyonuna 45 dakika süre ile daldırıldı. Daha sonra paslanmaz çelik plakalar yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu. Kuruyan paslanmaz çelik plakalar,

etanol:asetik asit (95:5) içeren kapların içerisinde 10 dakika süre ile bekletildi. Bu aşamadan sonra her bir denemenin yapıldığı kaptan 100µl alınarak bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 570 nm olan filtre ile ELISA (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) okuyucuda okutuldu. Aynı suş iki farklı kuyucukta tekrarlı bir şekilde çalışılarak okutuldu. Sonuçlar, negatif kontrol (sadece besiyeri) ve pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan *S.aureus* ATCC 25923 suşu ile inkübe edilen çelik plakalarla yapılan uygulamadan elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi (Şahin, 2007; Sandberg ve ark., 2008).

2.2.8. Paslanmaz Çelik Plakalarda Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması

İzole edilen Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık 1.5 x 10^8 kob/ml), içerisinde % 0.9 (w/v) NaCl içeren fizyolojik tuzlu su bulunan süspansiyonlar hazırlandı. %2 (w/v) glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) içeren cam kavanozlara, hazırlanmış olan süspansiyonlardan 0.22 ml aktarılarak, içerisine yerleştirilen 20 x 40 x 1 mm'lik paslanmaz çelik plakalar ile birlikte 37°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edildi (Binder, BD 115, Tuttlingen, Almanya). İnkübasyon sonunda her bir kavanozdaki paslanmaz çelik plakar çıkarılarak içerisinde %2 (w/v) ve %10 (w/v) konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan sitrik asit, malik asit ve % 0.3 (v/v) konsantrasyonda perasetik asit ile 200 ppm konsantrasyonda aktif klor bulunan kavanozların içerisine yerleştirildi. Sitrik asit, kitosan, malik asit ve perasetik asit ile 20 dakika süre ile, aktif klorla ise 5 dakika süre ile muamele edildikten sonra sitrik asit, malik asit ve perasetik asit içeren kavanozlara ayrı ayrı yerleştirilen çelik plakalar durulanmadan kurutularak % 0.5 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan kristal viyole solüsyonu içeren kavanozlarda 45 dakika süre ile bekletildi. 200 ppm konsantrasyondaki aktif klorla 5 dakika süre ile muamele edilen plakalar ise 6 kez yıkandıktan sonra % 0.5 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan kristal viyole solüsyonu içeren kavanozlara yerleştirildi ve 45 dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda plakalar yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu. Kuruyan çelik plakalar etanol:asetik

asit (95:5) içeren kavanozların içerisinde 10 dakika süre ile bekletildi. Bu aşamadan sonra, her denemenin yapıldığı kavanozdan 100 µl alınarak bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 570 nm olan filtre ile ELISA (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) okuyucuda okutuldu. Her suş iki farklı kuyucukta tekrarlı bir şekilde çalışıldı. Sonuçlar, negatif kontrol (sadece besiyeri) ve pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan *S.aureus* suşu ATCC 25923 ile inkübe edilen çelik plakalarla yapılan uygulamalardan elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi (Şahin, 2007; Sandberg ve ark., 2008).

2.2.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Minitab 15 programı ile yapıldı. *P* değerleri tek kuyruklu *t*-testi ile dezenfektan olarak kullanılan organik asitlerin, süt işletmelerinde halen uygulanmakta olan kimyasallara alternatif olabileceği hipotezine dayanılarak belirlendi. $P \leq 0.05$ bulunan denemelerin sonuçları istatistiksel açıdan "önemli" olarak değerlendirildi (Marques ve ark., 2007).

3. BULGULAR

3.1. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri

Bu tez çalışmasında, 50 farklı çiğ süt örneği, %0.1 (w/v)'lik peptonlu su ile uygun seri dilüsyonlar olacak şekilde dilüe edilerek Baird Parker Agar'a ekildi. Üreyen koloniler arasından şeffaf zonlu siyah merkezli 20 tipik, zonsuz 4 atipik koloni izole edildi. İzole edilen suşların Gram boyama, katalaz, koagulaz, DNAz testleri ve biyokimyasal özellikleri ise API Staph testi uygulanarak incelendi.

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen tipik ve atipik kolonilerle yapılan çalışmalarda kolonilerin 24 tanesinin Gram pozitif, 24 tanesinin katalaz ve koagulaz pozitif, 16 tanesinin DNAz pozitif, 8 tanesinin DNAz negatif olduğu görüldü (Çizelge 3.1). Suşların 24 tanesinin ise yapılan APIStaph testlerine göre Stafilokok suşu olduğu tespit edildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun biyokimyasal özellikleri.

Suş No	Baird Parker Agar	Gram Boyama	Katalaz	Koagulaz	DNAz
1	Tipik	+	+	+	+
2	Tipik	+	+	+	+
3	Tipik	+	+	+	+
4	Tipik	+	+	+	+
5	Tipik	+	+	+	+
6	Tipik	+	+	+	+
7	Tipik	+	+	+	+
8	Tipik	+	+	+	+
9	Tipik	+	+	+	+
10	Tipik	+	+	+	+
11	Tipik	+	+	+	+
12	Tipik	+	+	+	+
13	Tipik	+	+	+	+
14	Tipik	+	+	+	-
15	Tipik	+	+	+	+
16	Tipik	+	+	+	-
17	Tipik	+	+	+	-
18	Tipik	+	+	+	-
19	Tipik	+	+	+	+
20	Tipik	+	+	+	-
21	Atipik	+	+	+	-
22	Atipik	+	+	+	+
23	Atipik	+	+	+	-
24	Atipik	+	+	+	-

Çizelge 3.2. APIStaph testi uygulanarak belirlenen, 50 çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik, 4 atipik koloninin biyokimyasal özellikleri.

Suş no	G	F	MN	ML	L	T	MT	K	MB	NIT	FS	VP	R	KS	S	MG	NA	LA	URE	SONUÇ
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	*S. epidermidis*
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S.aureus*
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S.aureus*
16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
17	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
19	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S. aureus*
21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	*S.lentus*
22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	*S.aureus*
23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	*S.lentus*
24	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	*S.lentus*

(G: Glukoz, F: Fruktoz, MN: Mannoz, ML: Maltoz, L: Laktoz, T: Trehaloz, MT: Mannitol, K: Ksilitol, MB:Melibioz, NIT: Nitrite indirgeme, FS: Alkalin Fosfataz, VP: Voges-Proskauer, R: Rafinoz, KS: Ksiloz, S: Sükroz, MG: Metil-αD-glukopiranozid, NA: N-asetil-glukozamin, LA: L-arjinin, URE: Üre)

3.2. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Oksasilin ve Vankomisin Antibiyotiklerine Karşı Dirençleri

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen stafilokok suşlarına oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençlilik testleri yapıldı.

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen tipik ve atipik Stafilokok kolonileriyle yapılan çalışmalarda kolonilerin 15 tanesinin oksasilin antibiyotiğine dirençli, 9 tanesinin ise oksasilin antibiyotiğine duyarlı olduğu tespit edildi. Vankomisin antibiyotiğine dirençlilik testinde ise 24 tanesinin de bu antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 3.3) .

Çizelge 3.3. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençleri.

Suş No	Oksasilin	Vankomisin
1	R	S
2	R	S
3	R	S
4	R	S
5	R	S
6	R	S
7	R	S
8	S	S
9	R	S
10	R	S
11	R	S
12	R	S
13	R	S
14	S	S
15	R	S
16	S	S
17	S	S
18	S	S
19	R	S
20	S	S
21	R	S
22	S	S
23	S	S
24	S	S

(S: Duyarlı, R: Dirençli)

3.3. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşturabilme Yetenekleri

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen Stafilokok suşlarının biyofilm oluşturabilme yetenekleri Kongo kırmızılı agara ekim yapılarak ve mikrotitrasyon plağı yöntemi ile ELİSA (BMG LABTECH FLUOstar Omega Elisa, Almanya) cihazı vasıtasıyla incelendi.

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen tipik ve atipik Stafilokok suşlarıyla yapılan biyofilm oluşumunun tespiti ile ilgili çalışmada, kolonilerin 16 tanesinin kongo kırmızılı agarda güçlü biyofilm oluşturdukları (koyu kırmızı renkli, ++), 8 tanesinin ise zayıf biyofilm (açık kırmızı renkli, +) oluşturdukları tespit edildi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile ELISA cihazı (BMG LABTECH FLUOstar Omega ELISA, Almanya) vasıtasıyla 570 nm'de ölçülen $0.1 \leq A_{570} \leq 1$ absorbans değerleri biyofilm pozitif olarak değerlendirildi (Abdallah ve ark., 2009). Buna göre kolonilerin 24 tanesinin de biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu belirlendi (Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 24 adet Stafilokok suşunun biyofilm oluşturabilme yetenekleri.

	Biyofilm Oluşumu	
Suş no	**Kongo Kırmızılı Agar**	**Mikrotitrasyon Plağı**
1	++	+
2	++	+
3	++	+
4	++	+
5	++	+
6	++	+
7	++	+
8	++	+
9	++	+
10	++	+
11	++	+
12	++	+
13	++	+
14	++	+
15	++	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	++	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+

3.4. İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi ve Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması

İzole edilen 24 suştan 4 suşun atipik olarak belirlenmesi nedeniyle çalışmaya sadece 20 tipik Stafilokok suşu ile devam edildi.

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun biyofilm oluşumunun doğal antimikrobiyaller (malik asit ve sitrik asit), klor ve perasetik asit ile engellenmesi (%) ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%)

mikrotitrasyon plağı ile paslanmaz çelik plakalarda olmak üzere iki farklı ortamda incelendi.

3.4.1. Mikrotitrasyon Plağında Klor Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun klor (200 ppm) uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun 200 ppm klor uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta %51 (P=0.20) oranında azaldığı, on suş ile ise yaklaşık %20-%30 (P<0.05) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.5.A).

Biyofilm tabakasının, 200 ppm klor uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla altı suşta yaklaşık %40-%60 (P<0.05) oranında, üç suşta ise yaklaşık %25-%30 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi (Çizelge 3.5.B)

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile yapılan denemelerde ise, 200 ppm klor uygulaması ile biyofilm oluşumunun %7 (P= 0.34) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %12 (P=0.20) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.5. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun klor (200 ppm) uygulaması ile önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmin klor (200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılması (%). (A: Biyofilm oluşumu öncesinde 5 dakika süre ile klor (200 ppm) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu sonrasında 5 dakika süre ile klor (200 ppm) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B
1	15 (0.03)	0 (0.00)
2	24 (0.01)	22 (0.00)
3	2 (0.03)	40 (0.05)
4	20 (0.05)	0 (0.08)
5	26 (0.02)	10 (0.00)
6	6 (0.05)	11 (0.08)
7	4 (0.01)	0 (0.00)
8	28 (0.00)	0 (0.01)
9	0 (0.00)	0 (0.00)
10	0 (0.08)	0 (0.00)
11	22 (0.00)	40 (0.05)
12	0 (0.00)	0 (0.00)
13	27 (0.2)	57 (0.06)
14	22 (0.00)	40 (0.00)
15	19 (0.02)	44 (0.00)
16	16 (0.03)	26 (0.00)
17	15 (0.02)	29 (0.00)
18	22 (0.00)	6 (0.00)
19	51 (0.00)	0 (0.00)
20	29 (0.05)	51 (0.00)
(+)* Kontrol	7 (0.04)	12 (0.01)
(-)* Kontrol	0 (0.00)	0 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.2. Çelik Plakalarda Klor Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun klor (200 ppm) uygulaması ile paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun 200 ppm klor uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta %35 (P=0.00) oranında azaldığı, iki suşta ise yaklaşık %20-%30 (P<0.05) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.6.A).

Biyofilm tabakasının, 200 ppm klor uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla iki suşta yaklaşık %45 (P<0.05) oranında, dokuz suşta ise yaklaşık %20-%40 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı (%) belirlendi (Çizelge 3.6.B)

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile paslanmaz çelik plakalarda yapılan denemelerde ise, 200 ppm klor uygulaması ile biyofilm oluşumunun azalmadığı, oluşan biyofilmin ise %45 (P=0.00) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.6. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun klor (200 ppm) uygulaması ile önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmin klor (200 ppm) uygulaması ile ortadan kaldırılması (%). (A: Biyofilm oluşumu öncesinde 5 dakika süre ile klor (200 ppm) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu sonrasında 5 dakika süre ile klor (200 ppm) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B
1	0 (0.02)	45 (0.02)
2	22 (0.02)	0 (0.01)
3	35 (0.02)	29 (0.00)
4	0 (0.02)	0 (0.02)
5	0 (0.00)	20 (0.03)
6	0 (0.00)	31 (0.01)
7	12 (0.06)	17 (0.02)
8	0 (0.04)	20 (0.04)
9	6 (0.01)	40 (0.00)
10	0 (0.12)	0 (0.07)
11	0 (0.05)	9 (0.02)
12	0 (0.01)	40 (0.00)
13	0 (0.00)	23 (0.05)
14	0 (0.02)	2 (0.00)
15	0 (0.03)	40 (0.00)
16	0 (0.03)	32 (0.00)
17	0 (0.03)	0 (0.04)
18	16 (0.00)	11 (0.02)
19	29 (0.02)	46 (0.00)
20	15 (0.00)	0 (0.00)
(+)* Kontrol	0 (0.01)	45 (0.03)
(-)* Kontrol	0 (0.02)	0 (0.01)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.3. Mikrotitrasyon Plağında Perasetik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun perasetik asitle (%0.3, v/v) uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta %50 (P=0.05) oranında azaldığı, sekiz suşta ise yaklaşık %20-%40 (P<0.05) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.7.A).

Biyofilm tabakasının, %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla üç suşta yaklaşık %50-%55 (P<0.05) oranında, sekiz suşta ise yaklaşık %20-%40 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı (%) belirlendi (Çizelge 3.7.B).

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile yapılan denemelerde ise, %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun azalmadığı, aynı zamanda oluşan biyofilmin de ortadan kaldırılamadığı belirlendi.

Çizelge 3.7. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun perasetik asitle (% 0.3, v/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin perasetik asitle (% 0.3, v/v) ortadan kaldırılması (%). (A:Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile perasetik asit (%0.3, v/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile perasetik asit (%0.3, v/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B
1	0 (0.02)	21 (0.00)
2	36 (0.04)	42 (0.03)
3	17 (0.02)	27 (0.08)
4	0 (0.00)	26 (0.00)
5	0 (0.02)	52 (0.02)
6	0 (0.00)	54 (0.03)
7	40 (0.00)	23 (0.01)
8	50 (0.00)	0 (0.01)
9	34 (0.00)	0 (0.01)
10	24 (0.03)	15 (0.00)
11	38 (0.11)	16 (0.04)
12	33 (0.00)	0 (0.03)
13	0 (0.06)	50 (0.04)
14	0 (0.02)	40 (0.00)
15	0 (0.01)	33 (0.00)
16	0 (0.00)	25 (0.00)
17	0 (0.00)	0 (0.03)
18	6 (0.03)	7 (0.00)
19	18 (0.05)	17 (0.01)
20	14 (0.02)	0 (0.07)
(+)* Kontrol	0 (0.01)	0 (0.00)
(-)* Kontrol	0 (0.00)	0 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.4. Çelik Plakalarda Perasetik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun perasetik asit (%0.3, v/v) uygulaması ile paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta %70 (P=0.00) oranında azaldığı, yedi suşta ise yaklaşık %20-%60 (P<0.05) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.8.A).

Biyofilm tabakasının, %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla altı suşta yaklaşık %60-%80 (P<0.05) oranında, sekiz suşta ise yaklaşık %20-%50 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı (%) belirlendi (Çizelge 3.8.B)

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile yapılan denemelerde ise, %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun % 41 (P=0.00) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %41 (P=0.00) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.8. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun perasetik asitle (%0.3, v/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin perasetik asitle (%0.3, v/v) ortadan kaldırılması (%). (A:Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile perasetik asit (%0.3, v/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile perasetik asit (%0.3, v/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B
1	13 (0.03)	68 (0.00)
2	70 (0.00)	53 (0.00)
3	0 (0.00)	25 (0.00)
4	49 (0.01)	26 (0.00)
5	0 (0.00)	45 (0.00)
6	30 (0.05)	64 (0.00)
7	0 (0.06)	64 (0.00)
8	0 (0.00)	0 (0.04)
9	0 (0.04)	20 (0.00)
10	0 (0.00)	15 (0.02)
11	57 (0.04)	31 (0.09)
12	20 (0.04)	78 (0.01)
13	28 (0.02)	27 (0.00)
14	0 (0.03)	0 (0.02)
15	0 (0.03)	14 (0.03)
16	29 (0.00)	68 (0.00)
17	0 (0.06)	0 (0.00)
18	0 (0.00)	0 (0.00)
19	36 (0.04)	75 (0.00)
20	0 (0.04)	25 (0.03)
(+)* Kontrol	41 (0.00)	41 (0.00)
(-)* Kontrol	16 (0.00)	70 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.5. Mikrotitrasyon Plağında Sitrik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun sitrik asit (%2 ve %10, w/v) uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla üç suşta yaklaşık %50-%55 ($P<0.05$) oranında azaldığı, dokuz suşta ise yaklaşık %20-%40 ($P<0.05$) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.9.A).

%10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta yaklaşık %62 ($P=0.04$) oranında azaldığı, dört suşta yaklaşık %30-%50 ($P<0.05$) oranında azaldığı tespit edildi (Çizelge 3.9.B).

Yapılan çalışmalarda %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun, 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla altı suşta yaklaşık %60-%70 ($P<0.05$) oranında, on suşta ise yaklaşık %20-%45 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi (Çizelge 3.9.C).

%10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla on suşta yaklaşık %70-%85 ($P<0.05$) oranında, dört suşta yaklaşık %60-%65 ($P<0.05$) oranında ve altı suşta yaklaşık %40-%55 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edildi (Çizelge 3.9.D).

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile yapılan denemelerde ise, %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun % 39 oranında ($P=0.00$) ve %10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile %27 ($P=0.10$) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %2 (w/v) sitrik asit uygulaması sonrasında %6 ($P=0.30$) oranında ve %10 (w/v) sitrik asit uygulaması sonrasında %84 ($P=0.01$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.9. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun sitrik asitle (% 2 ve % 10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin sitrik asitle (% 2 ve % 10, w/v) ortadan kaldırılması (%). (A:Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile sitrik asit (%2, w/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile sitrik asit (% 10, w/v) uygulaması, C: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile sitrik asit (% 2, w/v) uygulaması, D: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile sitrik asit (% 10, w/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B	C	D
1	0 (0.02)	0 (0.00)	7 (0.00)	44 (0.00)
2	20 (0.02)	40 (0.02)	62 (0.06)	77 (0.00)
3	21 (0.00)	0 (0.00)	68 (0.03)	80 (0.00)
4	0 (0.03)	0 (0.04)	46 (0.03)	83 (0.00)
5	0 (0.07)	0 (0.02)	71 (0.01)	71 (0.00)
6	0 (0.06)	0 (0.04)	68 (0.00)	77 (0.00)
7	0 (0.04)	0 (0.00)	33 (0.00)	62 (0.00)
8	56 (0.00)	31 (0.00)	41 (0.00)	53 (0.00)
9	31 (0.00)	0 (0.00)	17 (0.00)	48 (0.00)
10	20 (0.00)	0 (0.00)	31 (0.00)	73 (0.00)
11	50 (0.07)	33 (0.02)	60 (0.02)	56 (0.03)
12	0 (0.06)	0 (0.00)	15 (0.00)	40 (0.03)
13	20 (0.14)	46 (0.08)	69 (0.03)	84 (0.05)
14	21 (0.00)	0 (0.01)	27 (0.00)	64 (0.00)
15	0 (0.04)	0 (0.01)	41 (0.00)	66 (0.00)
16	24 (0.00)	0 (0.02)	25 (0.02)	66 (0.01)
17	20 (0.00)	0 (0.00)	25 (0.00)	73 (0.00)
18	13 (0.02)	14 (0.00)	11 (0.00)	72 (0.00)
19	55 (0.03)	62 (0.00)	25 (0.00)	55 (0.01)
20	21 (0.01)	0 (0.00)	41 (0.07)	86 (0.02)
(+)* Kontrol	39 (0.03)	27 (0.00)	6 (0.00)	84 (0.01)
(-)* Kontrol	0 (0.04)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.6. Çelik Plakalarda Sitrik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun sitrik asit (%2 ve %10, w/v) uygulaması ile paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla dört suşta %60-%80 ($P<0.05$) oranında azaldığı, yedi suşta ise yaklaşık %30-%50 ($P<0.05$) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.10.A).

%10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla iki suşta yaklaşık %85 ($P<0.05$) oranında azaldığı, on suşta yaklaşık %40-%70 ($P<0.05$) oranında azaldığı tespit edildi (Çizelge 3.10.B).

Yapılan çalışmalarda %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun, 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla on dört suşta %80-%90 ($P<0.05$) oranında, dört suşta ise yaklaşık %60-%75 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi (Çizelge 3.10.C).

%10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla on sekiz suşta yaklaşık %80-%95 ($P<0.05$) oranında, iki suşta yaklaşık %60-%80 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edildi (Çizelge 3.10.D).

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile paslanmaz çelik plakalarda yapılan denemelerde ise, %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun %54 ($P=0.04$); %10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile %68 ($P=0.04$) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %2 (w/v) sitrik asit uygulaması sonrasında %86 ($P=0.03$); %10 (w/v) sitrik asit uygulaması sonrasında %90 ($P=0.03$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.10. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun sitrik asitle (% 2 ve % 10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin sitrik asitle (% 2 ve % 10, w/v) ortadan kaldırılması (%). (A: Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile sitrik asit (%2, w/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile sitrik asit (% 10, w/v) uygulaması, C: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile sitrik asit (% 2, w/v) uygulaması, D: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile sitrik asit (% 10, w/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B	C	D
1	0 (0.04)	0 (0.07)	73 (0.00)	88 (0.00)
2	0 (0.01)	53 (0.00)	62 (0.00)	77 (0.02)
3	36 (0.02)	60 (0.00)	82 (0.00)	93 (0.00)
4	75 (0.00)	68 (0.02)	82 (0.00)	93 (0.00)
5	47 (0.00)	6 (0.05)	82 (0.00)	87 (0.00)
6	41 (0.01)	82 (0.02)	87 (0.00)	90 (0.04)
7	66 (0.07)	0 (0.14)	91 (0.00)	89 (0.02)
8	18 (0.02)	0 (0.04)	82 (0.00)	83 (0.00)
9	0 (0.00)	45 (0.00)	80 (0.00)	88 (0.00)
10	0 (0.09)	28 (0.00)	84 (0.00)	88 (0.00)
11	60 (0.04)	84 (0.00)	92 (0.00)	95 (0.00)
12	7 (0.02)	0 (0.01)	89 (0.00)	66 (0.19)
13	42 (0.05)	44 (0.04)	86 (0.00)	93 (0.01)
14	24 (0.00)	43 (0.00)	81 (0.00)	85 (0.00)
15	50 (0.00)	43 (0.02)	72 (0.00)	82 (0.00)
16	51 (0.12)	66 (0.01)	74 (0.00)	85 (0.06)
17	13 (0.1)	0 (0.06)	50 (0.01)	80 (0.02)
18	46 (0.02)	65 (0.01)	80 (0.00)	91 (0.00)
19	79 (0.02)	72 (0.02)	90 (0.00)	95 (0.00)
20	0 (0.06)	25 (0.02)	54 (0.02)	87 (0.00)
(+)* Kontrol	54 (0.00)	68 (0.00)	86 (0.00)	90 (0.00)
(-)* Kontrol	0 (0.09)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

(* Pozitif kontrol *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol steril TSB besiyeri)

3.4.7. Mikrotitrasyon Plağında Malik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun malik asit (%2 ve %10, w/v) uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %2 (w/v) malik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla iki suşta yaklaşık %40-%50 ($P<0.05$) oranında azaldığı, dört suşta ise yaklaşık %15-%20 ($P<0.05$) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.11.A).

%10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla bir suşta yaklaşık %47 ($P=0.20$) oranında azaldığı, altı suşta yaklaşık %20-%40 ($P<0.05$) oranında azaldığı tespit edildi (Çizelge 3.11.B).

Yapılan çalışmalarda %2 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun, 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla sekiz suşta %70-%80 ($P<0.05$) oranında, sekiz suşta yaklaşık %40-%60 ($P<0.05$) oranında ve iki suşta ise %20-%30 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi (Çizelge 3.11.C).

%10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla sekiz suşta yaklaşık %70-%85 ($P<0.05$) oranında, beş suşta yaklaşık %50-%65 ($P<0.05$) oranında ve yedi suşta ise %30-%45 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edildi (Çizelge 3.11.D).

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile yapılan denemelerde ise, %2 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun % 3 ($P=0.30$); %10 (w/v) malik asit uygulaması ile %7 ($P=0.30$) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %2 (w/v) malik asit uygulaması sonrasında %82 ($P=0.01$); %10

(w/v) malik asit uygulaması sonrasında %80 (P=0.01) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge 3.11. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun malik asitle (% 2 ve % 10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin malik asitle (% 2 ve % 10, w/v) ortadan kaldırılması (%). (A:Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile malik asit (%2, w/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile malik asit (% 10, w/v) uygulaması, C: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile malik asit (% 2, w/v) uygulaması, D: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile malik asit (% 10, w/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

Suş No	A	B	C	D
1	14 (0.00)	4 (0.00)	28 (0.01)	43 (0.00)
2	48 (0.02)	47 (0.00)	73 (0.00)	76 (0.00)
3	16 (0.08)	20 (0.07)	79 (0.00)	85 (0.00)
4	17 (0.05)	24 (0.04)	80 (0.00)	69 (0.00)
5	4 (0.03)	24 (0.00)	69 (0.01)	77 (0.00)
6	6 (0.02)	13 (0.02)	75 (0.01)	76 (0.01)
7	43 (0.00)	38 (0.00)	44 (0.00)	38 (0.02)
8	23 (0.00)	11 (0.02)	46 (0.00)	40 (0.02)
9	0 (0.00)	1 (0.00)	0 (0.06)	37 (0.00)
10	0 (0.07)	0 (0.1)	69 (0.00)	76 (0.01)
11	0 (0.05)	0 (0.06)	41 (0.01)	60 (0.02)
12	0 (0.08)	0 (0.03)	0 (0.4)	34 (0.01)
13	10 (0.00)	0 (0.00)	81 (0.02)	85 (0.03)
14	0 (0.03)	0 (0.00)	46 (0.00)	53 (0.00)
15	0 (0.04)	0 (0.04)	54 (0.02)	32 (0.07)
16	22 (0.01)	30 (0.00)	60 (0.00)	64 (0.01)
17	0 (0.03)	20 (0.00)	51 (0.00)	62 (0.01)
18	0 (0.00)	6 (0.00)	44 (0.03)	56 (0.01)
19	2 (0.00)	8(0.00)	23 (0.02)	45 (0.00)
20	1 (0.06)	0 (0.03)	70 (0.03)	83 (0.00)
(+)* Kontrol	3 (0.00)	7 (0.06)	82 (0.00)	80 (0.00)
(-)* Kontrol	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

3.4.8. Çelik Plakalarda Malik Asit Uygulamaları

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 tipik Stafilokok suşunun malik asit (%2 ve %10, w/v) uygulaması ile paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşmunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelendi.

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunun %2 (w/v) malik asit uygulaması ile 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla dört suşta %70-%85 ($P<0.05$) oranında azaldığı, üç suşta %40-%60 ($P<0.05$) oranında ve iki suşta ise yaklaşık %20 ($P<0.05$) oranında azaldığı belirlendi (Çizelge 3.12.A).

%10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla üç suşta yaklaşık %65-%80 ($P<0.05$) oranında azaldığı, dört suşta yaklaşık %20-%30 ($P<0.05$) oranında azaldığı tespit edildi (Çizelge 3.12.B).

Yapılan çalışmalarda %2 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun, 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla sekiz suşta %80-%85 ($P<0.05$) oranında, dokuz suşta yaklaşık %60-%75 ($P<0.05$) oranında ve üç suşta ise yaklaşık %40-%55 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi (Çizelge 3.12.C).

%10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun 20 tipik Stafilokok suşu arasında en fazla altı suşta yaklaşık %90-%95 ($P<0.05$), on iki suşta yaklaşık %70-%85 ($P<0.05$), iki suşta ise yaklaşık %60 ($P<0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edildi (Çizelge 3.12.D).

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu ile paslanmaz çelik plakalarda yapılan denemelerde ise, %2 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun %75 ($P=0.03$); %10 (w/v) malik asit uygulaması ile %75 ($P=0.04$) oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise %2 (w/v) malik asit uygulaması

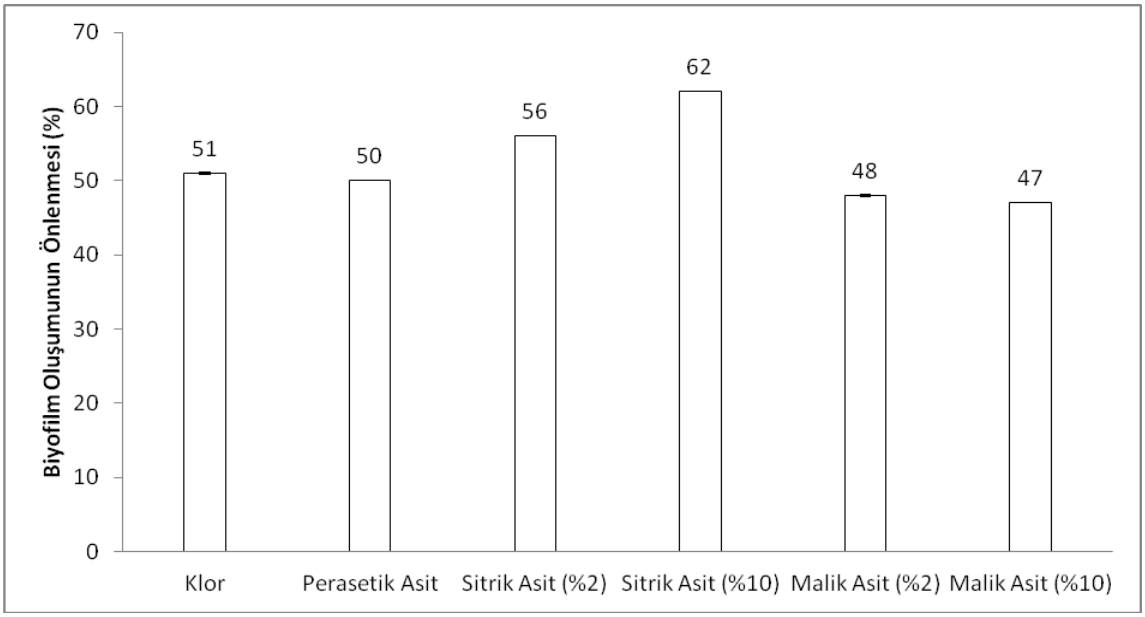
sonrasında %76 (P=0.01); %10 (w/v) malik asit uygulaması sonrasında %82 (P=0.00) oranında ortadan kaldırıldığı belirlendi.

Çizelge.3.12. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun malik asitle (% 2 ve % 10, w/v) önlenmesi (%) ve oluşan biyofilmlerin malik asitle (% 2 ve % 10, v/v) ortadan kaldırılması (%). (A:Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile malik asit (%2, w/v) uygulaması, B: Biyofilm oluşumu öncesinde 20 dakika süre ile malik asit (% 10, w/v) uygulaması, C: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile malik asit (% 2, w/v) uygulaması, D: Biyofilm oluşumu sonrasında 20 dakika süre ile malik asit (% 10, w/v) uygulaması). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

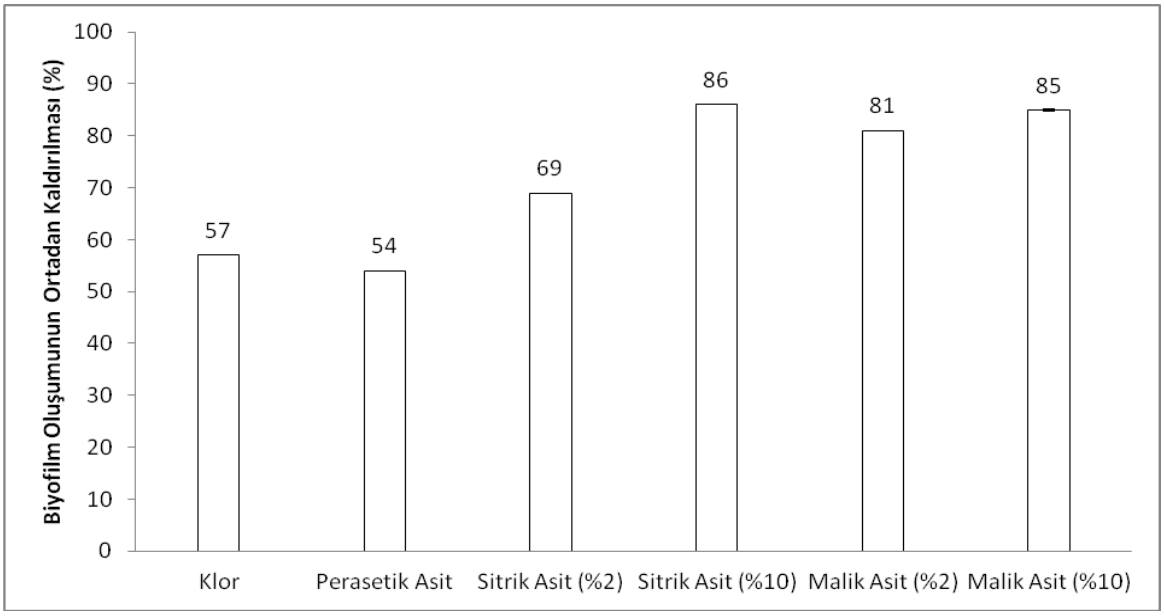
Suş No	A	B	C	D
1	85 (0.04)	0 (0.09)	84 (0.00)	83 (0.00)
2	78 (0.02)	0 (0.19)	83 (0.02)	83 (0.00)
3	74 (0.03)	0 (0.11)	85 (0.00)	79 (0.01)
4	8 (0.09)	0 (0.2)	63 (0.00)	79 (0.00)
5	23 (0.02)	66 (0.07)	67 (0.02)	83 (0.00)
6	2 (0.01)	30 (0.3)	82 (0.00)	73 (0.01)
7	0 (0.04)	0 (0.04)	66 (0.03)	85 (0.00)
8	0 (0.02)	0 (0.08)	64 (0.00)	82 (0.00)
9	5 (0.00)	0 (0.00)	60 (0.02)	82 (0.00)
10	0 (0.03)	8 (0.05)	75 (0.00)	81 (0.00)
11	70 (0.02)	79 (0.02)	75 (0.05)	95 (0.00)
12	0 (0.02)	15 (0.06)	85 (0.00)	95 (0.00)
13	60 (0.00)	67 (0.02)	80 (0.00)	90 (0.01)
14	0 (0.08)	20 (0.02)	40 (0.00)	60 (0.00)
15	0 (0.00)	0 (0.03)	64 (0.01)	84 (0.00)
16	42 (0.03)	0 (0.07)	80 (0.00)	90 (0.00)
17	0 (0.03)	20 (0.1)	42 (0.01)	59 (0.02)
18	6 (0.04)	14 (0.07)	55 (0.00)	73 (0.00)
19	60 (0.01)	0 (0.00)	70 (0.07)	90 (0.02)
20	20 (0.04)	21 (0.15)	86 (0.01)	90 (0.00)
(+)* Kontrol	75 (0.00)	75 (0.00)	76 (0.04)	82 (0.00)
(-)* Kontrol	0 (0.00)	0 (0.04)	73 (0.00)	75 (0.00)

(* Pozitif kontrol: *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suş, negatif kontrol: steril TSB besiyeri)

50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun, mikrotitrasyon plağı ve paslanmaz çelik plakalarda klor (200 ppm), perasetik asit (0.03, v/v), sitrik asit (%2 ve %10, w/v) ve malik asit (%2 ve %10, w/v) ile biyofilm oluşumunun en çok önlendiği (%) ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırıldığı (%) değerler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de sunuldu.

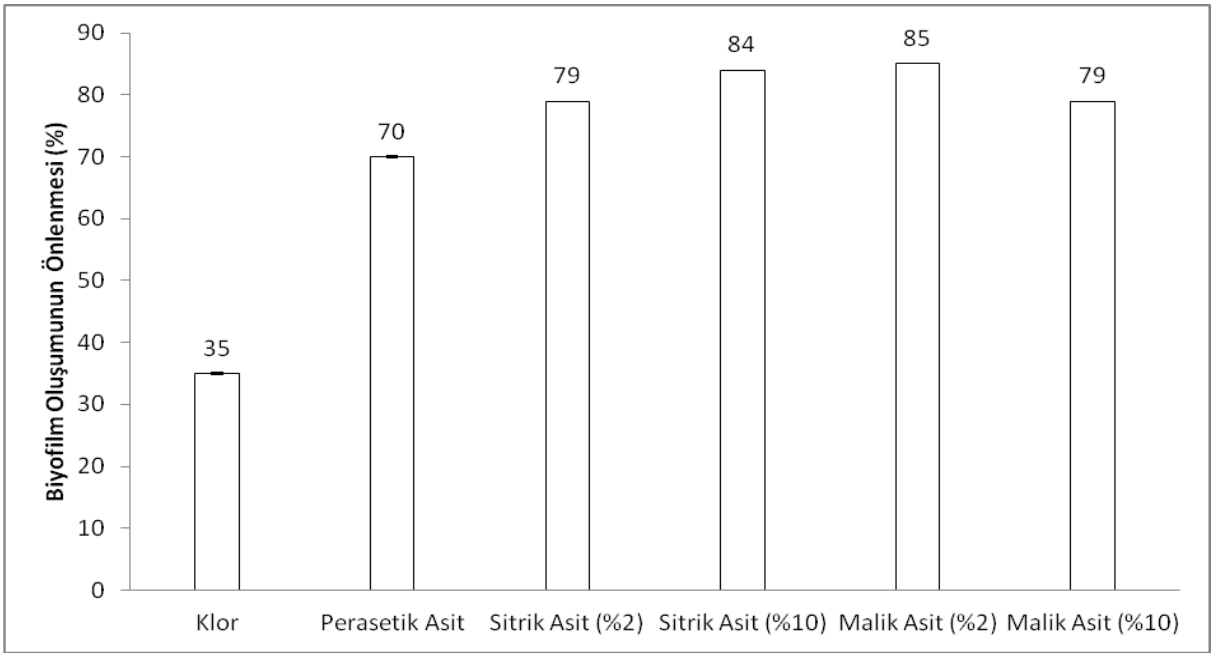


(a)

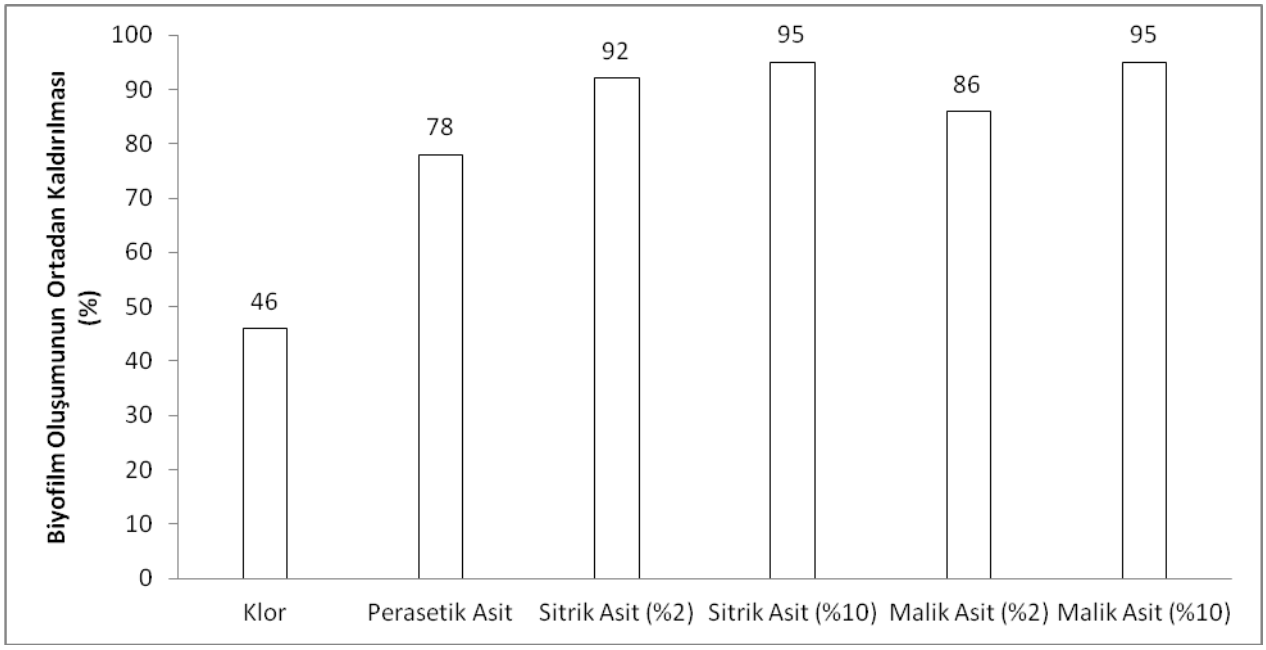


(b)

Şekil 3.1. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun mikrotitrasyon plağında klor (200 ppm), perasetik asit (0.03, v/v), sitrik asit (%2 ve %10, w/v) ve malik asit (%2 ve %10, w/v) ile biyofilm oluşumunun en çok önlendiği (%) değerler (a) ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırıldığı (%) değerler (b). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.



a)



(b)

Şekil 3.2. 50 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 20 adet Stafilokok suşunun paslanmaz çelik plakalarda klor (200 ppm), perasetik asit (0.03, v/v), sitrik asit (%2 ve %10, w/v) ve malik asit (%2 ve %10, w/v) ile biyofilm oluşumunun en çok önlendiği (%) değerler (a) ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırıldığı (%) değerler (b). Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları (σ_{n-1}) göstermektedir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 50 farklı çiğ süt örneğinden 20 tipik Stafilokok ve 4 atipik Stafilokok suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşların Gram boyama, katalaz, koagulaz ve DNAz testleri ve biyokimyasal özellikleri incelenerek tanımlanmıştır.

İzole edilen ve tanımlanan 24 adet Stafilokok suşuna oksasilin ve vankomisin antibiyotiklerine dirençlilik testleri uygulanmıştır. Uygulanan bu testler sonucunda 15 suşun oksasiline dirençli, 9 suşun ise oksasiline duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen 24 suşun vankomsine duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çiğ süt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan 24 tipik Stafilokok suşunun biyofilm oluşturabilme yetenekleri Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda izole edilen suşların biyofilm oluşturabilme yeteneklerinin her iki yöntemle de belirlenebildiği ve sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Biyofilm oluşumu ciddi ekonomik kayıplara ve sağlık problemlerine yol açmaktadır. Sanayide paslanmaz çelik, cam, kauçuk ve polipropilen yüzeyler patojenik mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla kontamine olabilmekte ve biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm için kullanılan yaygın dezenfektanlar arasında perasetik asit, ozon ve klor yer almaktadır.

Elde edilen verilere göre, %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun en fazla %56 oranında azaldığı; oluşan biyofilmin de en fazla %71 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. %10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun en fazla %62 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin en fazla %86 oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir.

Paslanmaz çelik plakalarda, %2 (w/v) sitrik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %80 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %92 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. %10 (w/v) sitrik asit uygulaması ile ise

biyofilm oluşumunun en fazla %85 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %95 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir.

%2 (w/v) malik asit uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun en fazla %48 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %80 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. %10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun en fazla %47 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %85 oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir.

Paslanmaz çelik plakalarda %2 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %85 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin ise en fazla %85 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. %10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun en fazla %79 oranında önlendiği, oluşan biyofilmin de en fazla %95 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir.

Yapılan bütün uygulamalarda sitrik asit ve malik asit konsantrasyonunun %2 (w/v)'den %10 (w/v)'a arttırılması ile biyofilm oluşumunun daha fazla oranda önlendiği ve oluşan biyofilmin daha fazla oranda ortadan kaldırıldığı görülmüştür. Ayrıca çelik plakalarda yapılan çalışmalarda mikrotitrasyon plağında yapılan çalışmalara göre azalma oranlarının çok daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Mikrotitrasyon plağında 200 ppm klor uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %51 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %57 oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir. Paslanmaz çelik plakalarda 200 ppm klor uygulaması ile ise biyofilm oluşumunun en fazla %35 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %44 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir.

Mikrotitrasyon plağında %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %50 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %54 oranında ortadan kaldırıldığı görülmüştür. Paslanmaz çelik plakalarda %0.3 (v/v) perasetik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %70 oranında azaldığı, oluşan biyofilmin de en fazla %78 oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun özellikle sitrik asit (%2-10) uygulaması ile klor (200ppm) ve perasetik asit (%0.3) uygulamaları ile elde edilenden yaklaşık 1.5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca oluşan biyofilmin ise hem sitrik asit (%2-10) hem de malik asit (%2-10) uygulamaları ile yine klor (200ppm) ve perasetik asit (%0.3) uygulamaları ile elde edilenden 1.5 kat daha fazla olacak şekilde ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir.

Paslanmaz çelik plakalarda sitrik asit (%2-10) ve malik asit (%2-10) uygulamaları ile hem biyofilm oluşumunun azaltılması (%) hem de oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması (%) oranlarının, klor (200ppm) ve perasetik asit (%0.3) uygulamaları ile elde edilen oranlardan çok daha fazla olduğu (2-2.5 kat) belirlenmiştir.

Paslanmaz çelik plakalarda biyofilm oluşumunun azaltılması ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranlarının mikrotitrasyon plağındaki uygulamalardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin yüzeyin fizikokimyasal özellikleri olabileceği ve yapışmayı etkileyebileceği düşünülmüştür. Bir çok araştırmacı mikroorganizmaların teflon ve diğer plastik materyaller gibi hidrofobik non polar yüzeylere cam veya metaller gibi hidrofilik yüzeylerden daha hızlı yapıştıklarını belirlemişlerdir (Fletcher ve Loeb, 1979; Pringle ve Fletcher, 1983; Bendinger ve ark., 1993).

Hücre yüzeyi hidrofobisitesi adhezyondan önemlidir. Bir çok bakteri negatif yüklüdür ancak hidrofobik yüzey kompanentleri içerir (Rosenberg ve Kjelleberg, 1986). Non polar kısımlara sahip hücre yüzeyi polimerleri (fimbriya, diğer proteinler ve Gram pozitif bakterilerin mikolik asitleri) hidrofobik yüzeylere yapışırken, EPS ve lipopolisakkaritler hidrofilik yüzeylere yapışırlar.

Yapılan bir çalışmada *S. epidermidis* suşlarının polistren yüzeylere yapışması hücre yüzeyi adhezinlerinin aktivitesine bağlı olduğu ve polisakkarit kapsular adhezin (PS/A) ve/veya yüzey proteinlerinin direkt olarak polistren yüzeylere yapışmada etkin oldukları belirtilmiştir (Mattos-Guaraldi ve ark., 1999; Krepsky ve

ark., 2003). Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar, çelik plakalardaki uygulamaların sanayide ki benzer çelik yüzeyler için umut verici olacağını göstermektedir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 numaralı suşu kullanılarak yapılan çalışmalarda ise, çelik plakalara klor, %2 ve %10 malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun engellenemediği, ancak diğer bütün uygulamalarda biyofilm oluşumunun azaltılması ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranlarının diğer izole edilen Stafilokok suşlarıyla elde edilen verilere yakın veya daha az değerler olduğu görülmüştür.

Klor ve bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi mikrobiyal membran, özellikle glukoz metabolizmasında iş gören hücresel enzimler, DNA ve hücre proteinleri üzerinedir (Wirtanen ve ark., 2000).

Klor mikroorganizmaları inaktive etme etkinliğinin yanında, hücre yüzey ekzopolisakkaritlerini de ortamdan uzaklaştırarak yeni bakterilerin yüzeye yapışmasına engel olmaktadır (Meyer, 2003). Ancak, klor, metal yüzeylerde korozyona neden olmakta, deri ve mukoza membranlara zarar vermekte ve trihalometanlar gibi karsinojenik ürünlerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle yeni ve doğal antimikrobiyallere ihtiyaç vardır.

Dezenfeksiyon işlemi sonrasında eğer durulama yapılmayacaksa, izin verilen maksimum düzey 200 ppm yani % 0.02 (v/v) konsantrasyondaki klor uygulamasıdır. Fakat zaman zaman önerilen kullanım düzeyleri değişiklik gösterebilmektedir.

Hipokloritlerin, 50 ppm (%0.005, v/v) konsantrasyonda en az 1dakika süre ile ve 24°C sıcaklıkta dezenfektan olarak kullanılması önerilmektedir. Her 10°C'lik sıcaklık düşüşünde, muamele süresinin iki katına çıkarılarak kullanılması tavsiye edilir. Kloraminin ise, 1 dakika süre ile 200 ppm (% 0.02, v/v) konsantrasyonda dezenfekte edilecek olan yüzeylere uygulanması gerektiği belirtilmektedir (Schmidt, 2012).

Gıda sanayinde perasetik asit yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Perasetik asit oksitleyici bir ortam oluşturarak, oluşturduğu reaktif oksijen terleri ile mikrobiyal inaktivasyona sebep olmaktadır. Sanayide perasetik asit kullanımı %0.3-%0.7 (v/v) oranında olabileceği vurgulanmıştır (Andrade ve Macedo, 1996). Schmidt (2012) tarafından PAA'in dezenfektan olarak %0.01 (v/v) ile %0.02 (v/v) konsantrasyonları arasında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Marquez ve ark. (2007)'nın yaptığı bir çalışmada, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde oluşturulan *S. aureus* biyofilminin %0.3 (v/v) perasetik asit ile muamelesinin mikroorganizma sayısını hidrojen peroksit ve diklaroizosiyanurat'a göre daha etkili bir şekilde yaklaşık 5 log kob/cm^2 azalttığı ancak Amerikan Halk Sağlığı Birliği (APHA)'nın uygun ve etkili hijyen için önerdiği maksimum limitler olan 2 kob/cm^2 veya Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) ile önerilen 30 kob/cm^2 limitini sağlayamadığı belirlenmiştir.

Ibusquiza ve ark. (2011)'nın *L. monocytogenes* bakterisinin üç farklı suşu ile yaptığı çalışmada, biyofilm tabakasının perasetik aside olan direnci araştırılmış, bu çalışma sonucunda ele alınan üç suşun birinde oldukça yüksek, diğer iki suşta ise daha az bir direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da mikroorganizmaların antimikrobiyallere olan direncinin suştan suşa farklılık gösterebileceğini ifade etmektedir. Bu tez çalışmasında da başta klor ve perasetik asit olmak üzere sitrik ve malik asitle yapılan deneylerde suşların farklı oranlarda inaktive olduğu görülmüştür.

Organik asitlerin hücre membranlarından kolaylıkla difüze olabildiği disosiye olmayan halinin disosiye hale dönüştüğü, hücre içini asidifiye ettiği, proton itici gücünü etkilediği ve böylece mikrobiyal inaktivasyona neden oldukları öne sürülmüştür (Vasseur ve ark., 1999)

Sitrik asit, çeşitli bitkiler tarafından doğal olarak üretilen bir hidroksil trikarboksilik asittir. Sitrik asit aynı zamanda, suda çözünebilen, doğrudan gıda ilavesi olarak kullanılabilen ve amacına uygun konsantrasyonlarda uygulandığında taze ve işlenmiş et ile kümes hayvanları üretim işletmelerinde de kullanım alanı bulabilen bir organik asittir.

Malik asit ise, çeşitli bitki ve meyve ile çilekte doğal olarak bulunan, karboksilik bir organik asittir. Sitrik asit gibi malik asidin de gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilmektedir (21CFR184).

Yapılan bir başka çalışmada, 250 mM sitrik asitin oluşan *Pseudomonas* biyofilmleri için hem sıvılaştırıcı hem de biyofilm matriksinde > %95 antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir (Lieleg ve ark., 2011). Araştırıcılar ayrıca biyofilm mekaniği ve bakteri canlılığının birbiriyle ilişkili olmadığını göstermiştir.

Over ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada ise, 75 mM malik asitin *S. Typhimurium* bakterisini 4 log kob/ml'ye kadar azalttığını belirlemişlerdir.

Doores (2005)'in yaptığı çalışmada, malik asitin antimikrobiyal etkisinin pH'yı düşürerek asidifikasyona neden olarak meydana getirdiğini rapor etmiştir.

Sitrik asitinin metal şelatları oluşturarak hücreleri tek karboksilik asit içeren laktik asitlere oranla daha fazla inhibe ettiği belirlenmiştir (Miller ve ark., 1993). Bu tez çalışmasında da, sitrik asidin (üç karboksil grubuna sahip) ve malik asitin (iki karboksil grubuna sahip) biyofilm oluşumundaki ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılmasındaki etkinliğinin de bu aktif gruplardan ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, Stafilokok suşlarının, biyofilm oluşturma özelliklerinin, bu çalışmada kullanılan sitrik asit ve malik asit gibi doğal antimikrobiyal maddelerle engellenmesi belirlenmemiştir. Biyofilmlerin oluşumunun önlenmesi ve oluşan biyofilmin azaltılması daha sonraki kontaminasyonlar ile alet ve ekipmanın korozyonunun önlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada uygulanan doğal antimikrobiyallerin (sitrik asit ve malik asit) daha farklı konsantrasyon ve sürelerle de uygulanabilirliğinin ve bu uygulamaların büyük ölçekte optimize edilerek sanayi de kullanılabilirliğinin araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, çalışmadan elde edilen sonuçlar, Türk ve Dünya bilimine yeni veriler sunarak önemli katkılar sağlayacak ve gıda sanayinde uygulanan klor, perasetik asit ve diğer

kimyasallara alternatif olarak bu doğal antimikrobiyallerin kullanım potansiyelini açığa çıkaracaktır.

5. KAYNAKLAR

1. **Aarnela, K., Lunde´n, J., Korkeala, H., Wirtanen, G. (2007)** Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT – Food Science and Technology*; 40: 1041–1048.

2. **Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., Bakhrouf, A. (2009)** Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*; 40:394-398.

3. **Andrade, N.J., Macêdo, J.A.B. (1996)** Higienização na indústria de Alimentos. *Livraria Varela*; 180.

4. **Austin, J.W., Bergeron, G. (1995)** Development of bacterial biofilms in dairy processing lines, *Journal of Dairy Research*; 62:509-519.

5. **Bendinger, B., Rijnaarts, HHM., Altendorf, K., Zehnder, AJB. (1993)** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol*; 59:3973-77.

6. **Bilgehan H. (2000)** Staphylococcus. *Klinik Mikrobiyoloji 10. Baskı, İzmir*; Fakülteler Kitabevi: 240-266.

7. **Bremer, PJ., Monk, I., Butler, R. (2002)** Inactivation of *Listeria monocytogenes/flavobacterium spp.* biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters in Applied Microbiology*; 35:321–325.

8. **Bremer, P.J., Fillery, S., McQuillan, A. J. (2006)** Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*; 106:254–262.

9. **Brock, TD., ve Madigan, MT. (2006)** Biology of Microorganisms, *Pearsen Prentice Hall, New Jersey, A.B.D.*; 11. Edition

10. **Brooks, JD., Flint, SH. (2008)** Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*; 43:2163-2176.

11. Carneiro, VA., Santos, HS., Arruda, FVS., Bandeira, PN., Albuquerque, MRJR., Pereira, MO., Henriques, M., Cavada, BS., Teixeira, EH. (2011) Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilmassociated infections. *Molecules*; 16:190-201.

12. Cengiz, AT. (1999) Staphylococcus.*Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Günes Kitabevi, 339-347.

13. Chmielewski, RAN., Frank, JF. (2006) A predictve model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT – Food Science and Technology*; 39:11–19.

14. Cloete, TE., Jacobs, L., Brozel, VS. (1998) The chemical control of biofouling inindustrial water systems. *Biodegradation*: 9, 23–37.

15. Cramton, SE., Gerke, C., Scnell, NF., Nichols, WW., Go¨tz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun*; 67:5427–5433.

16. Davison, J. (1999) Genetic exchange betweeen bacteria and environment. *Plasmid*; 42:73-91.

17. Dogan, B., Boor, K.J. (2003) Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*; 69:130–138.

18. Donlan, RM. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*.; 8:881-890.

19. Douglas, LJ., (2003) Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*; 11:30-36.

20. Dykes, GA., Sampathkumar, B., Korber, DR. (2003) Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology*; 80:1–10.

21. Doores, S. (2005) Organic acids.In P.M.Davidson, & A.L. Branen (Eds.). Antimicrobials in foods; 3: 95-136.

22. Evans, LV. (2000) Biofilms: Recent Advances in their Study and Conrol. *Harwood, Academic Publisher, Amsterdam*; 19-24.

23. Faille, C., Fontaine, F., Benezech, T. (2001) Potential occurance of adhering living Bacillus spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology*; 90: 892-900.

24. Fletcher, M., Loeb, GI. (1979) Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* ;37:67-72

25. Foster, TJ., Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.;* 12: 484–488.

26. Forsythe, SJ., Hayes, PR. (1998) Food hygiene, microbiology and HACCP (3rd ed.). *Aspen Publishers.*

27. Freeman, DJ., Falkiner, FR., Keane, CT. (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*; 42: 872–874.

28. Gibson, HJ., Taylor, H., Hall, KE., Holah, JT. (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*; 87:41–48.

29. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, YY., Gymoese, P., Vogel, BF. (2007) Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*; 18:1165–1171

30. Gülbandılar, A. (2006) Kütahya Yöresinde Çeşitli Kaynaklardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu, *Doktora Tezi, Anadolu Ünv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Eskişehir*.

31. Hall-Stoodley, L, Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol;* 13:7-10.

32. Holah, JT. (1992) Industrial monitoring: hygiene in food processing. In L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, B. Capdeville (Eds.), Biofilms. *Science and technology;* 645–659).

33. Hussain, M., Wilcox, MH., White, PJ. (1993) The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol*.;10:191-207.

34. Ibusquiza, PS., Herrera, JJR., Cabo, ML. (2011) Resistance to benzalkonium chloride, perasetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*; V.28:418-425.

35. Jain, A., Agarwal A. (2009) Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods;* 76:88–92.

36. James, GA., Beaudette, L., Costerton, JW. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J. Industrial Microbiology*; 15:257-262.

37. Jenkinsonh, F., Lapin-Scott, HM. (2000) Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol*.; 9:9-10.

38. Karagözlü, C., Karagözlü, N., (2004) Süt Endüstrisinde Deterjan ve Dezenfektan Kalıntılarının Önemi. *HR. Ü.Z.F. Dergisi*; 8(3/4): 73-81.

39. Kloos, WE., Bannerman, TL. Staphylococcus and Micrococcus (1999) In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Ed, Washington DC, ASM Press, 1999: 264-277.

40. Koneman, EW., Allen, SD., Janda, WM., Schreckenberger, PC.., Winn, WC. (1997) The Gram-Positive cocci Part I: *Staphylococci* and Related Organisms. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 5th Ed, Philadelphia, JB Lippincott Company; 405- 446.

41. Koluman, A. (2006) Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi, http://www.vetgida.ankara.edu.tr/bilimsel

42. Krepsky, N., Ferreira, RBR., Nunes, APF., Lins, UGC., Filho, FCS., Mattos-Guaraldi, AL., Netto-dosSantos, KR. (2003) Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian Isolates. Curr Microbiol; 46:280-286.

43. Kuda, T., Yano, T., Kuda, M. T. (2008) Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT – Food Science and Technology*; 41:988–993.

44. Kumar, CG., Anand, SK. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: review. *International Journal of Food Microbiology*; 42: 9–27.

45. Lagido, C., Wilson, IJ., Glover, LA., Prosser, JI. (2003) A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces. *FEMS Microbiol.Eco.;* 44:67-78.

46. Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S. (2006) Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology;* 109: 229–233.

47. Lasa, I., Penades, JR. (2006) Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*; 157:99–107.

48. Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B. (2000) Use of ELISA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl.Environ.Microbiol*.; 66:1851.

49. Lieleg, O., Ribbeck, K. (2011) Biological hydrogels as selective diffusion barriers. *Trends in Cell Biology*; 21(9): 543-551.

50. Lindsay, D., Holy A. (2006) Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know .Journal of Hospital Infection; 64: 313-325

51. Lowy, FD. (1998) *Staphylococcus aureus* infections . *N Engl J Med*; 339: 520-532.

52. Madigan, MT., Martinko, JM., (2010) Brock mikroorganizmaların biyolojisi, *Palme Yayıncılık*; 8:221.

53. Marquez, SC., Rezende, OS., Alves, F., Silva, BC., Alves, E., Abreus, LR., Piccoli, RH. (2007) Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*; 38:538-543.

54. Mattos-Guaraldi, AL., Formiga, LCD., Andrade, AFB. (1999) Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting Corynebacterium diphtheriae strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol* ; 38:37-42.

55. Maukonen, J., Ma¨tto¨ , J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M. (2003) Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 30:327–356.

56. Meyer, B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *İnternational Biodeterioration*;v.51:249-253.

57. Miller, AJ., Call, JE., Whiting, RC. (1993) Comparison of organic acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey product. *Journal of Food Protection*; 56:958-962.

58. Mosteller, TM., Bishop, JR. (1993) Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection*; 56:34–41.

59. Oliver, SP., Jayarao, BM., Almeida, RA. (2005) Food borne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease;* 2:115–129.

60. Orth, R. (1998) The importance of disenfection for the hygiene in the dairy and baverage production. *International Biodeterioration and Biodegration;* 41:201-208.

61. Over, K., Hettiarachchy, N., Johnson, M., Davis, B. (2009) Effect of organic acid and plant extracts on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in broth culture model and chicken meat systems. *Journal of food Science*; 74:515-521.

62. Öner, Z., Ölmez, Z., (2006) Süt sanayisinde biyofilm oluşumu ve önleme yöntemleri, *Hasad Gıda*; 22, 256, 56-60.

63. Patti, JM., Allen, BL., McGavin, MJ., Hook, M.(1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Ann Rev Microbiol*; 48:585–617.

64. Post, JC., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, GD. (2004) The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*; 12: 185-190.

65. Pringle, JH., Fletcher, M. (1983) Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*; 45:811-17.

66. Raffa, RB., Iannuzzo, JR., Levine, DR., Saeid, KK., Schwartz, RC., Sucic, NT., Terleckyj, OD., Young, JM. (2005) Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*; 312: 417-423.

67. Reinermann, D.J., Wong, A.L., Rabotski, E., (1993) Interaction of chemical, thermal, and physical actions on the removal of bacteria from milk contact surfaces. *The American Society of Agricultural Engineers*; 93:33-36.

68. Rosenberg, M., Kjelleberg, S. (1986) Hydrofobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology; 9:353-93.

69. Ryan, RP., Dow, JM. (2008) Diffusive signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*; 154:1845–1858.

70. Sandberg, M., Määttänen, A., Peltonen, J., Vuorela PM., Fallarero A. (2008) Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents;* 32: 233–240.

71. Saraçlı, MA. (2006) "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletisim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi*; 48: 244-250.

72. Seifu, E., Buys, EM., Donkin, EF., Petzer, IM. (2004) Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against foodborne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control*; 15:447–452.

73. Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, JE., Zweifel, C., Stephan, R. (2004) Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*; 101:101–107.

74. Schmidt, RH. (2012) Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. *University of Florida IFAS Extension*. http://edis.ifas.ufl.edu .

75. Sharma, M., Anand, SK. (2002a) Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*; 19:627–636.

76. Simo˜es, M., Simo˜es, LC., Machado, I., Pereira, MO., Vieira, MJ. (2006) Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*; 84:338–345.

77. Simo˜es, M., Simo˜es, L., Vieira MJ. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food sciens and Techonology*; 43:573-583.

78. Sutherland, IW. (2001) Biofilm exopolysaccharites: A strong and sticky framework. *Microbiology*; 147:3-9.

79. Şahin, R. (2007) *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, PAMUKKALE Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Pamukkale.

80. Tolker, N., Molin S. (2000) Spatial organisation of microbial biofilm communities. *Microbiology of Ecology*; 40:75-84.

81. Vancraeynest, D., Hermans, K., Haesebrouck, F. (2004) Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol*; 103:241–247.

82. Vasseur, C., Beverel, L., Hebraud, M., Labadie, J. (1999) Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes. J. Appl. Microbiol.;* 86:469-476.

83. Villard, L., Lamprell, H., Maurin, F., Noel, Y., Beuvier, E., Chamba, JF., Kodjo, A. (2005) Enterotoxin D Producing Strains of *Staphylococcus aureus* are Typeable by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), *Food Microbiolgy*; 22:261-265.

84. Vuong, C., Otto, M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect*; 4: 481–489.

85. Waak, E., Tham, W., Danielsson-Tham, ML. (2002) Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in

farm tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*; 68:3366–3370.

86. Watnick, P., Kolter, R.(2000) Biofilm city of microbes. *Minireview. J Bacteriol*; 182: 2675-2679.

87. Webb, JS., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol;*6:578-585

88. Wirtanen, G., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. (2000) Biofilms – impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), Biofilms II: Process analysis and applications; 327–372.

89. Wirtanen, G., Husmank, U., Mattilla- Sandholm, T. (1996) Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilms cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protective*; V.59:727-733.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba KÖKÜMER 24 Mayıs 1984 yılında Sakarya'da doğdu. 2003 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2007 yılında tamamladıktan sonra 2008 yılında Adapazarı Ticaret Borsası Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda Mikrobiyoloji Bölüm Sorumlusu olarak işe başladı. 2009 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı ve yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir.