

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN LISTERIA SPP. VE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ BİYOFİLM
OLUŞUMLARININ KONTROLÜ

SELEN KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

OCAK 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN LISTERIA SPP. VE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ
BİYOFİLM OLUŞUMLARININ KONTROLÜ

SELEN KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

OCAK 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

CONTROL OF BIOFILM FORMATION BY STRAINS OF
LISTERIA SPP. AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS.
ISOLATED FROM CHEESE

SELEN KAYA

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

JANUARY 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 30/ 12 /2024 tarih ve 2024 / 68 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 16/ 01 /2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Selen KAYA'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

:Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE

:Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

:

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



Aileme
ve
Yavuz Uzun'a

ÖZET

Bu tez çalışmasında 5 farklı tür olmak üzere toplamda 42 adet tüketime sunulan peynir örneğinden 9 adet *Staphylococcus aureus* ve 5 adet *Listeria monocytogenes* suşu izole edilerek tanımlandı. Kuşburnu (*Rosa canina* L.) meyve ekstraktı (RC), etanol kullanılarak ve mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi uygulanarak elde edildi. Tanımlanan 14 adet suş arasından güçlü biyofilm oluşturma kapasitesi olduğu tespit edilen *S. aureus* (SAC9) ve *L. monocytogenes* (LMP5 ve LMC9) suşları üzerinde RC meyvesi ekstraktının farklı konsantrasyonları uygulamalarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinlikleri araştırıldı.

RC ekstraktının direkt kullanımı ve agar kuyu difüzyon yöntemi ile suşlar üzerinde 6-14 mm aralığında inhibisyon zon çapları ölçülerek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlendi. RC ekstraktının SAC9 izolatu üzerinde Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) 1.1 mg mL^{-1} (% 8.4 inhibisyon) iken, LMP5 izolatu (% 20 inhibisyon) ve LMC9 izolatları (%13 inhibisyon) için 2.2 mg mL^{-1} olarak tespit edildi. Kuşburnu ekstraktının SAC9, LMP5 ve LMC9 suşları üzerinde antibiyofilm etkinliği (%93-100) olduğu belirlendi. SAC9 izolatu için Minimal Biyofilm İnhibisyon konsantrasyonu (MBİK) 4.4 mg mL^{-1} (% 17 inhibisyon); LMP5 izolatu 0.2 mg mL^{-1} (% 24 inhibisyon) ve LMC9 izolatları için 4.4 mg mL^{-1} (%22 inhibisyon) olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, elde edilen veriler, kuşburnu ekstraktının kullanılan antimikrobiyallere alternatif olarak antimikrobiyal/antibiyofilm etkileri ile sağlık alanında ve gıda sanayinde kullanılabileceğine yönelik bilgiler sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Rosa canina*, Antimikrobiyal, Bitkisel ekstrakt, Biyofilm biyokontrolü, Peynir, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

In this thesis study, 9 *Staphylococcus aureus* and 5 *Listeria monocytogenes* strains were isolated and identified from a total of 42 cheese samples, consisting of 5 different types, offered for consumption. Rosehip (*Rosa canina* L.) fruit extract (RC) was obtained using ethanol and a microwave-assisted extraction method. Among the 14 identified strains, *S. aureus* (SAC9) and *L. monocytogenes* (LMP5 and LMC9) strains determined to have strong biofilm-forming capacities were selected to investigate the antimicrobial and antibiofilm activities of different concentrations of RC fruit extract. The direct use of RC extract and the agar well diffusion method demonstrated antimicrobial activity, with inhibition zone diameters ranging between 6-14 mm on the strains. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of RC extract was determined as 1.1 mg mL⁻¹ for the SAC9 isolate (%8.4 inhibition), while it was 2.2 mg mL⁻¹ for the LMP5 (%20 inhibition) and LMC9 (%13 inhibition) isolates.

The antibiofilm activity of the rosehip extract on SAC9, LMP5, and LMC9 strains was found (93-100%). The Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) was determined as 4.4 mg mL⁻¹ (%17 inhibition) for the SAC9 isolate, 0.2 mg mL⁻¹ (%24 inhibition) for the LMP5 isolate, and 4.4 mg mL⁻¹ (%22 inhibition) for the LMC9 isolates.

In conclusion, the obtained data provide insights into the potential use of rosehip extract in healthcare and the food industry as an alternative to conventional antimicrobials due to its antimicrobial and antibiofilm effects.

Keywords: *Rosa canina*, Antimicrobial, Plant extract, Biofilm biocontrol, Cheese, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

TEŞEKKÜR

Başta, her zaman yol göstericiliği ile yanımda olan yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen bu çalışmayı tamamlamamda en büyük destekçim olan danışmanım sayın Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a, Çalışmam boyunca yanımda olan, geçirdiğimiz seneler boyunca arkadaşlıkları ile yanımda olup bu süreci daha değerli ve unutulmaz kılan, laboratuvar içerisinde ve dışarısında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Pelin KİRAZ'a,

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde sundukları değerli destek ve katkılar için Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. Biyoteknolojik Ürünler Üretim Tesisi (AbdiBio) ve Merieux Nutrisciences Türkiye'ye teşekkür ederim.

Hayallerime ve hedeflerime her zaman inanan, bana her daim destek veren Yavuz UZUN'a ve aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda Endüstrisinde Patojenler	2
2.1.1. Gıda Patojenleri ve Dekontaminasyonları	5
2.2. Peynirde <i>S. aureus</i> ve <i>L. monocytogenes</i>	7
2.2.1. Peynirde <i>S. aureus</i>	8
2.2.2. Peynirden İzole Edilen <i>S. aureus</i> suşları ve Gıda Zehirlenmeleri	10
2.2.3. Peynirde <i>Listeria spp.</i> ve <i>L. monocytogenes</i>	11
2.2.4. Peynirden İzole Edilen <i>L. monocytogenes</i> suşları ve Gıda Zehirlenmeleri	14
2.3. Biyofilm	16
2.3.1. Biyofilm Oluşum Modeli	17
2.4. <i>S. aureus</i> Suşları ile Biyofilm Oluşumu	18
2.4.1. <i>S. aureus</i> suşları ile Biyofilm Oluşum Mekanizmaları	19
2.4.1.1 Polisakkarit Intersellüler Adezin (PIA)-Bağımlı Mekanizma	19
2.4.1.2 Protein-Bağımlı Mekanizma	20
2.4.1.3 Hücre Dışı DNA (eDNA) Bağımlı Mekanizma	20
2.4.2. <i>S. aureus</i> suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Regülasyonu	21
2.5. <i>L. monocytogenes</i> suşları ile Biyofilm Oluşumu	21
2.5.1. <i>L. monocytogenes</i> suşları ile Biyofilm Oluşum Mekanizmaları	22
2.6. <i>S. aureus</i> ve <i>L. monocytogenes</i> suşlarının Oluşturdukları Biyofilmlerin Gıda Endüstrisindeki Önemi	23
2.7. <i>S. aureus</i> ve <i>L. monocytogenes</i> Suşlarının Oluşturdukları Biyofilmler ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	25
2.8. Bitki Bazlı Biyoaktif Bileşikler ve Önemi	27
2.9. Bitki Bazlı Biyoaktif Bileşikler ile Bakteriyel Biyofilmlerin Biyokontrolünün Sağlanması	29
2.10. <i>Rosa canina</i> L. Bitkisinin Genel Özellikleri	30
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	32
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	32
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	32
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	33
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Peynir Örneklerinin Toplanması	33
3.2.2. <i>Listeria</i> türlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	34

3.2.2.1. Klasik Yöntem ile <i>Listeria spp.</i> ve <i>monocytogenes</i> 'in İzolasyonu	34
3.2.2.2. VIDAS Yöntemi ile <i>Listeria spp.</i> ve <i>monocytogenes</i> 'in İzolasyonu	344
3.2.2.2.1 VIDAS LDUO Yöntemi ile <i>Listeria spp.</i> ve <i>monocytogenes</i> 'in İzolasyonu	34
3.2.2.2.2 VIDAS LMO2 Yöntemi ile <i>Listeria spp.</i> ve <i>monocytogenes</i> 'in İzolasyonu	35
3.2.2.3 API <i>Listeria</i> ile Şüpheli <i>L. monocytogenes</i> Suşlarının Konfirmasyonu	36
3.2.2.3.1. API <i>Listeria</i> metodu	36
3.2.2.3.2. Gram boyama	36
3.2.2.3.3. Hemoliz Testi	37
3.2.3. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyonu ve Karakterizasyonu	37
3.2.3.1. Baird Parker Agar ile <i>S. aureus</i> İzolasyonu	37
3.2.3.2. Gram Boyama	38
3.2.3.3. MALDI-TOF-MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)	38
3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	38
3.2.5. <i>Rosa canina</i> L. Ekstraktlarının Hazırlanması	39
3.2.6. Ekstraktın Kuru Madde Tayini	39
3.2.7. İzolatların Biyofilm Oluşum Kapasitesinin İncelenmesi	39
3.2.8. Ekstraktın Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi	40
3.2.9. Ekstraktın Minimal İnhibisyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	41
3.2.10. Ekstraktın Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi	41
3.2.11. İstatiksel Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1. Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu	43
4.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	43
4.1.2. <i>S. aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	46
4.1.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	50
4.2. Ekstraktın Kuru Madde İçeriği	51
4.3. İzolatların Biyofilm Oluşum Kapasitesinin İncelenmesi	52
4.4. RC Ekstraktının Antimikrobiyal Etkileri	53
4.4.1. RC Ekstraktının Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi	53
4.4.2. RC Ekstraktının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	58
4.5. RC Ekstraktının Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi	60
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)
BPA	: Baird Parker Agar
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
g	: Gram
G	: Gentamicin
Kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
LB-A	: Luria-Bertani Agarlı Besiyeri
MBK	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
MBİK	: Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu
mg	: Miligram
MHB	: Mueller Hinton Besiyeri
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
RC	: Rosa canina
RPF	: Rabbit Plasma Fibrinogen
Rpm	: Revolutions per minute
TSB	: Triptik Soya Besiyeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1: <i>L. monocytogenes</i> için API sayısal profil örneği	36
Şekil 4.1: a: ALOA agar üzerinde ve b: PALCAM agar üzerinde <i>L. monocytogenes</i> kolonilerinin görüntüsü	43
Şekil 4.2: LMC9 izolatının API görüntüsü	45
Şekil 4.3: LMC9 izolatının APIWEBTM yazılımı sonuç raporu	45
Şekil 4.4: LMC9 izolatının %5 koyun kanı içeren Columbia agar görüntüsü	46
Şekil 4.5: Baird-Parker Agar üzerinde <i>S. aureus</i> görüntüsü (a) ve Rabbit Fibrinojen Plazma Agar üzerinde <i>Staphylococcus aureus</i> görüntüsü (b)	47
Şekil 4.6: <i>S. aureus</i> 'un MALDI-TOF-MS cihazındaki spektrum görüntüsü	47
Şekil 4.7: <i>S. aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu Akış Şeması	48
Şekil 4.8: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) SAC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri	54
Şekil 4.9: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) LMP5 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri	55
Şekil 4.10: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) LMC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri	56
Şekil 4.11: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) <i>S. aureus</i> ATCC 6538 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri	57
Şekil 4.12: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (a: 1, b: 1:2, c: 1:4, d: 1:8, e: 1:16 ve f: 1:32) LMC9 izolatı üzerinde etkileri	58
Şekil 4.13: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) SAC9 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri	60
Şekil 4.14: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) LMP5 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri	61
Şekil 4.15: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) LMC9 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri	62
Şekil 4.16: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) <i>S. aureus</i> 6538 bakterisi üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri	62

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Farklı peynir türleri ile ilişkili bildirilen listeriosis salgınları	13
Tablo 2.2: <i>icaADBC</i> operonu tarafından kodlanan genler ve genlerin ürünleri	20
Tablo 2.3: <i>L. monocytogenes</i> 'in biyofilm oluşumundaki moleküler belirleyiciler	23
Tablo 3.1: Yerel halk ve pazarlardan toplanan peynirlerin yapıldığı süt çeşidi, peynir yağ çeşidi, peynirlerin türleri ve adetleri.	33
Tablo 4.1: <i>L. monocytogenes</i> şüphelisi tespit edilen kolonilerin izolat kodları, Tv değerleri ve izole edildiği peynirlerin özellikleri	44
Tablo 4.2: İzole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının izolat kodları ve peynir bilgileri	48
Tablo 4.3: <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> izole edilen peynir bilgileri ve izolat kodları	50
Tablo 4.4: Peynirlerden elde edilen laktik asit bakteri sayıları	51
Tablo 4.5: RC Ekstraktının farklı konsantrasyonlarda (1-1:512) içerdiği kuru madde miktarı (mg mL ⁻¹)	52
Tablo 4.6: İzolatların OD 570 nm değerleri ile biyofilm oluşturma kapasiteleri	53
Tablo 4.7: RC ekstraktının SAC9, LMP5, LMC9 izolatları ve <i>S. aureus</i> ATCC 6538 bakterisi üzerinde Minimal İnhibisyon (MİK, MİK50, MİK70 ve MİK90, mg mL ⁻¹) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) (mg mL ⁻¹).	59

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), güvenli olmayan gıdaların her yıl dünya genelinde 600 milyon gıda kaynaklı hastalığa, 420.000 ölüme ve 33 milyon yıl kaybına neden olduğunu tahmin etmektedir. Bu veriler, gıda güvenliğinin önemini vurgulamakta ve gıda kaynaklı hastalıkların ciddi bir küresel sağlık sorunu oluşturduğunu göstermektedir [WHO, 2018]. Hükümetlerin, bu sorunları önlemek için hijyen standartlarını sıkı bir şekilde denetlemesi ve çevre dostu teknolojilere geçiş yapması gerekmektedir.

Fermente ürünlerin üretim alanlarının hijyenik olması, özellikle peynir üretiminde kritik bir öneme sahiptir. Çiğ süt, peynir yapımında doğal bir başlangıç kültürü olarak kullanılırken, yeterli sterilizasyon yapılmadığında bakteriyel patojenlerin peynire bulaşma riski artmaktadır. *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*, peynir üretiminde en büyük tehlikeyi oluşturan bakterilerdir [Hernandez-Cortez et al., 2017]. Bu nedenle, peynirdeki mikroorganizmaların pastörizasyon öncesi ve sonrası doğru bir şekilde tanımlanması son derece önemlidir.

Gıda tesislerinde patojenik biyofilmler, mikrobiyal kontaminasyonun başlıca kaynakları arasında yer almaktadır. Bu biyofilmler, gıda sanayinde kullanılan klor, perasetik asit gibi dezenfektanlara karşı direnç geliştirebilir ve bu durum gıda ürünlerine patojen bakterilerin bulaşma riskini artırır. Ayrıca, toksik etkili olabilen bu ticari dezenfektanların *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojen bakterilerin biyofilmlerine karşı etkileri sınırlıdır. Bunu yanı sıra, laktik asit bakterileri gibi diğer mikroorganizmaların *Listeria monocytogenes*'i koruyarak biyofilm direncini artırdığı da gözlemlenmiştir [Van der Veen ve Abee, 2011].

Antibiyotikler, gıda patojeni kaynaklı zehirlenme gibi tedavilerde kritik bir rol oynamaktadır, ancak antibiyotiklere karşı dirençli patojenlerin yayılması, modern tıbbın en büyük zorluklarından biridir. Antibiyotiklerin aşırı veya yanlış kullanımı, antibiyotik direncine yol açarak, tedavi edilebilir enfeksiyonları daha tehlikeli hale getirebilir [Ventola, 2021]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), antibiyotik direncinin küresel bir sağlık tehdidi oluşturduğunu vurgulamaktadır [World Health Organization,

2023]. Bu sorunun çözülmesi, antibiyotiklerin yalnızca gerekli durumlarda ve doğru şekilde kullanılmasını gerektirir.

Doğal antimikrobiyaller, antibiyotiklere karşı alternatif, tamamlayıcı tedavi seçenekleri sunmaktadır. Sarımsak (*Allium sativum*) ve çay ağacı yağı (*Melaleuca alternifolia*) gibi bitkisel ürünler, antibakteriyel etkileri ile dikkat çekmektedir [Yuan et al., 2021]. Bu doğal bileşiklerin genellikle düşük yan etki profilleri ile öne çıkması, ucuz ve çevreyle dost olması onları bazı bakterilere karşı etkili tedavi seçenekleri haline getirebilir [Gorman et al., 2022].

Gıda sanayinde kullanılan bazı kimyasallar, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak ve mikroorganizmaların çoğalmasını engellemek için antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Ancak, bu kimyasalların sağlık üzerindeki potansiyel zararlı etkileri uzun süredir tartışılmaktadır. Sülfür dioksit (E220) ve sülfatlar gibi maddeler, bazı gıda ürünlerinde alerjik reaksiyonlara ve astım gibi solunum problemlerine yol açabilir [Li et al., 2021].

Nitrik ve nitritler (E250, E251), özellikle işlenmiş et ürünlerinde kullanılır. Ancak, bu kimyasalların aşırı tüketimi, kanserojen etkileri olan nitrozaminler üretmesine yol açabilir [Huang et al., 2020]. Bunun yanı sıra, BHA (Butylated HydroxyAnisole) ve BHT (Butylated HydroxyToluene) gibi maddeler, yağ içeren gıdalarda kullanılmakta olup, bazı hücrelerde kansere yol açabilecek etkiler göstermiştir [Wang et al., 2022]. Bu bulgular, biyofilmlerin temizlenmesinde kullanılan dezenfektanların sınırlı etkinliğini ortaya koymakta ve daha etkili hijyen yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Biyofilm oluşumunu kontrol altına almak, gıda güvenliği açısından kritik bir adımdır.

Bitki bazlı biyoaktif bileşikler, bakterilerin biyofilm oluşturmalarını engelleyebilir. Bazı bitkisel bileşikler, bakteriyel suşların biyofilm oluşturmalarını engelleyen quorum-sensing mekanizmasını hedef alır. Ancak bakterilerin zamanla bu ajanlara direnç geliştirebileceği göz önünde bulundurularak, daha yeni ve etkili bitkisel antibiyofilm bileşenlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, araştırmacılar doğal koruyucular ve bitki özleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bitki ekstraktlarının düşük toksisitesi ve potansiyel biyolojik aktiviteleri, bunları doğal koruyucular ve antimikrobiyal/biyofilm ajanları olarak değerlendirilmesine olanak tanır [Khouchlaa et al., 2017; Bouyahya et al., 2021; Salehi et al., 2021].

Kuşburnu (*Rosa canina* spp.), Orta Avrupa, Orta Doğu ve Asya'da doğada yaygın olarak bulunan bir bitki olup, tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır [Ercisli, 2007]. Kuşburnu, C vitamini, çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidanlar ve tanenler gibi yüksek düzeyde biyokimyasal bileşenler içerdiğinden önemli bir besin ve fitokimyasal kaynağıdır [Leahu A. et al., 2014, Ahmad et al., 2016, Mármol et al., 2017].

Bu nedenle, bu tez çalışması, kuşburnu meyveekstraktının farklı peynirlerden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkilerini ve biyofilm oluşumunun biyokontrolü aktivitelerini araştırmayı hedeflemektedir.

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışması, farklı peynir türlerinden izole edilen *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarının gıda kaynaklı çevresel etkilerini en aza indirmeye yardımcı olarak küresel gıda güvenliğine katkıda bulunmayı amaçlamıştır. Elde edilen izolatların ayrıca biyofilm oluşturma yeteneklerinin olduğu saptanmıştır. Kuşburnu meyvesi ekstraktı ile yapılan biyofilm biyokontrolü çalışmasında doğal suşların biyofilm oluşturma özellikleri hakkında bilgiler edinilmiştir. Ekstraktın antimikrobiyal etkilerini araştırmak amacıyla agar kuyu difüzyonu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemleri kullanılmıştır. İzolatların biyofilm oluşumlarının biyokontrolü için ise 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak polistren yüzeyde oluşan biyofilmlerin kuşburnu ekstraktı ile inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ekstraktın izole edilen *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, hali hazırda bu suşlarla kontamine olan süt ürünlerini ve süt işleme alanlarını patojen mikroorganizmalardan ve biyofilmlerinden kuşburnu meyvesi ekstraktı gibi doğal bir ajanla arındırılmasına yönelik katkılar sağlayacaktır. Böylelikle doğayla dost, ucuz ve kullanılan antimikrobiyallere alternatif, insan sağlığına zararlı etkileri olmayan antimikrobiyal/antibiyofilm etkileri olabilen doğal antimikrobiyallerin sağlık alanında ve gıda sanayinde kullanımlarına yeni bilgiler sunulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Endüstrisinde Patojenler

Gıda endüstrisi, küresel olarak büyüyen, insanlığın temel gereksinim ürünlerini sağlayan, sosyo-ekonomik etkilere sahip bir sanayi dalıdır. Bu endüstrinin herhangi bir adımında rol alan etmenlerin (örneğin; üretim sahası, ambalajlama, satış) doğru ve sağlıklı bir şekilde ilerlemesi büyük önem arz etmektedir, çünkü gıda kaynaklı hastalıklar gıda endüstrisiyle paralel bir şekilde büyüme göstermektedir. Hatta çoğu zaman gıda kaynaklı hastalıklar büyük perakende satışların yapıldığı yerlerde salgın hastalıklara dahi sebep olabilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınlamış olduğu bir rapora göre, her yıl dünya genelinde 600 milyon kişi tükettikleri gıda sebebi ile hastalanmakta ve 420.000 kişi ise gıda kaynaklı hastalıklardan dolayı hayatını kaybetmektedir [WHO, 2018]. Bu yüksek rakamlar, hükümetler için halk sağlığı politikalarını ve ekonomilerini yönetme konusunda büyük bir endişe kaynağı oluştururken, aynı zamanda hastalıkların ve ölümlerin nedenleri üzerine araştırma yapılması ve bunların önlenmesine odaklanılması gerektiği konusunda da büyük bir endişe uyandırmaktadır. Dünya Bankası'nın yayınlamış olduğu bir başka raporda ise, gıda kaynaklı hastalıklarının yıllık maliyetinin 95,2 milyar dolar, tedavi maliyetinin ise 15 milyar dolar olduğu belirlenmiştir [Dünya Bankası, 2018]. Hükümetler, halk sağlığını korumak ve bu büyük bütçe harcamalarının önüne geçebilmek için gıda üretim alanlarının hijyenik koşullarının sağlanması, çapraz kontaminasyonun önlenmesi ve gıda ambalajlarının sterilizasyonu gibi önlemleri almak ve alınan önlemlerinin endüstride birebir uygulanıp uygulanmadığı denetlemek zorundadır. Bu amaçla, gıda endüstrisinde çevre dostu teknolojiler tercih edilebilir. Örneğin, üretici firmaların geleneksel ısıtma işlem yöntemlerinin yerine, besin içeriklerinin korunduğu alternatif yöntemlere geçiş yapmak önemlidir. Ayrıca, gıdaların hijyenik kalitesinin artırılması, işlenmesi, sınıflandırılması ve paketlenmesinde biyosensörler ve çok amaçlı enzimler gibi teknolojik araçlardan etkin bir şekilde faydalanmak mümkündür. Bu faaliyetler, gıda endüstrisinde sağlıklı ve güvenli üretimi desteklerken halk sağlığını koruma ve maliyetleri azaltma potansiyeline sahiptirler. Çevre dostu teknolojiler ise enerji ve kaynak verimliliğini artırarak sürdürülebilir üretim sürecine olanak sağlayacaktır.

2.1.1. Gıda Patojenleri ve Dekontaminasyonları

Gıda temaslı yüzeylerde bulunan bakterilerin çapraz kontaminasyon riskini artırdığı bilinmektedir. Özellikle peynir üretim alanları gibi ıslak yüzeylerde bakteri üremesi daha fazla olabileceğinden, kuru yüzeylere göre kontaminasyon riski daha yüksek kabul edilmekte ve bu üretim alanları gıda endüstrisinde riskli bölgeler olarak görülmektedir. Ancak her bakteri suşunun kendine özgü özellikleri olduğu ve suşların bu özellikleri sayesinde çeşitli koşullara uyum sağlayıp hayatta kalabildikleri de unutulmamalıdır. Bu nedenle, gıda endüstrisinde riskli bölgelerden biri olarak kabul edilen peynir üretim alanlarında bakteri kontaminasyonunun önlenmesi için bulaş ihtimali muhtemel bakteriler iyi analiz edilerek uygun önlemler alınmalıdır.

Gıdaların hasat, işleme, depolama, dağıtım, nakliye veya hazırlık süreçlerinde herhangi bir noktada bu mikroorganizmalarla kontaminasyon oluşabilir. Kontamine gıdalar ise başta akut ishali mide bulantısı, kusma ve karın ağrısı olmak üzere gastrointestinal hastalıklara ve beslenme bozukluklarına yol açabilir. Spesifik olarak belirtmek gerekirse;

- *Salmonella spp.* bulaşları semptomatik Salmonelloza yol açarak ishal, ateş, karın krampları ve kusmaya sebep olur [Sykes ve McDonough, 2021].
- *L. monocytogenes*, genellikle ateş ve kas ağrılarıyla kendini gösteren ve bazen öncesinde ishal veya gastrointestinal semptomlarla seyreden Listeriosise neden olabilmekte ve erken tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilmektedir [Koupmans et al., 2023].
- *S. aureus* ise pnömoni, osteomyelit, septik artrit, bakteriyemi, endokardit, apse/çıban ve diğer deri enfeksiyonlarına yol açabilir [Otto, 2014].
- *Campylobacter* enfeksiyonu kanlı ishal, ateş ve mide krampları, hassas bağırsak sendromu, geçici felç ve artrit gibi komplikasyonlara neden olur [Amin et al., 2023].
- *Vibrio* bakterileri karın krampları, mide bulantısı, kusma, ateş, titreme ve sulu ishale sebep olabilmektedir [Baker-Austin et al., 2018].
- *Cronobacter* bakterileri ciddi kan dolaşımı enfeksiyonlarına veya beyni ve omurgayı koruyan zarların iltihaplanmasına neden olabilir [Blackwood ve Hunter, 2016].

- *Clostridium botulinum*, botulizme sebep olmaktadır ve bu hastalıkta gözlemlenen semptomlar genellikle göz, yüz, ağız ve boğazı kontrol eden kasların zayıflamasıdır. Ayrıca nefes almayla ilgili kaslar da zayıflayabilir, dolayısıyla nefes almada güçlük çekilerek ölümle sonuçlanabilir [Rawson et al., 2023].
- *Escherichia coli* O157:H7 hemorajik kolit ve hemolitik-üremik sendrom semptomlarına sebep olmaktadır ve erken tanı olmadığı takdirde bu semptomlar ölüme sebep olmaktadır [Rani et al., 2021].

1984 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıda hijyeni “gıdanın üretimi, işlenmesi, depolanması, dağıtımı ve hazırlanması süreçlerinde gereken tüm koşul ve önlemlerin sağlanarak gıdanın güvenli, sağlıklı ve insan tüketimine uygun hale getirilmesi” olarak tanımlanmıştır [Mason et al., 1984].

Gıda sanayinde yüzey temizliğinde sıklıkla kullanılan dezenfektanlara karşı *Salmonella spp.* ve *E. coli* gibi bazı bakteriler direnç geliştirme kapasitesine sahiptir [Bianco, C. et al., 2006; Álvarez-Ordóñez et al., 2011]. Bu nedenle, bir yüzey geleneksel temizleyiciler ile ne kadar dikkatli temizlenirse temizlensin bakteri bulaş riski her zaman kaçınılmaz olacaktır. Bu hususta atlanılmaması gereken konu temizlik ve dezenfeksiyonun farklı prosedürler olduğudur. Temizlik, görünür maddelerin ortadan kaldırılması suretiyle dezenfeksiyon sürecinin etkinliğini artıran bir prosestir. Bu görünür maddeler organik maddeler olabilmektedir. Organik maddeler ise bakteriler için üreme alanları olabilir. Bu nedenle, esas olan dezenfeksiyon sürecidir. Mikroorganizmaların insan sağlığı için güvenli kabul edilen seviyeye düşmesini dezenfeksiyon işlemi sağlar. Dezenfeksiyon yöntemi seçilirken gıdanın insanlarla doğrudan temas ettiği gerçeği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, gıda işleme yüzeyini dezenfekte etmenin en iyi yolları arasında bakteriyosinler, bakyeryofajlar, mantarlar, fitokimyasallar, bitki özleri, uçucu yağlar, fotokataliz ve enzimatik tedaviler gibi yenilikçi doğal yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler gıda güvenliğini sağlamada etkili olabilir ve hijyenik standartların karşılanmasına yardımcı olabile potansiyeline sahiptirler.

2.2. Peynirde *S. aureus* ve *L. monocytogenes*

Günlük yaşamda sıklıkla tüketilen gıdaların üretim alanlarının hijyenik olması büyük önem taşır. Özellikle peynir gibi fermente süt ürünlerinin üretim sürecinde başlangıç kültürleri kullanılarak başlandığı için sterilizasyonun sağlanması, olası kontaminasyonun engellenmesinde kritik bir rol oynar.

Peynir, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan ve sıklıkla gıda kaynaklı salgınlara sebep olan geleneksel bir gıdadır. Peynir yapımında fermentasyon işlemine başlarken laktik asit bakterileri doğal faydalı flora başlangıç kültürü olarak kullanılır. Sütün asitlenmesini hızlandırmak ve peyniri korumak için yapılan bu seçim aynı zamanda bakteriyel patojenlerle rekabete de izin verecektir. Bu patojenler, peynir yapımında kullanılan sütte bulunabilir, üretim sürecinde hayatta kalarak peynire bulaşabilir. Ayrıca, yeterli dezenfeksiyon sağlanmadığında üretim sonrasında da bakteriyel patojenlerin peynire bulaşma riski olacaktır. Mikrobiyal patojenlerin rekabeti ve büyümesini etkileyen faktörler arasında pH, tuz oranı ve su aktivitesi (a_w) yer alır. Örneğini olgunlaştırılmış yumuşak peynirler, eskitilmiş sert peynirlere göre mikrobiyal patojenlerin büyümesi için daha elverişli koşullar sağlar ve bu nedenle tüketim açısından daha riskli olabilmektedirler.

L. monocytogenes ve *S. aureus* bakterileri, peynirin güvenliğini tehdit eden ve en büyük riski oluşturan en yaygın iki bakteriyel patojendir [Hernandez-Cortez et al., 2017]. Bu patojen bakterilerin peynir üzerindeki etkisine katkıda bulunan faktörler arasında, kullanılan sütün kalitesi, başlangıç kültürü ve doğal laktik asit bakterilerinin gelişimi, tuz, pH ve peynirin olgunlaşma süresince meydana gelmekte olan kimyasal değişiklikler yer almaktadır [Johnson et al., 1990c]. Peynir üretiminde kullanılan çiğ süt, bu faktörlerin gelişime katkı sağlayarak *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un varlığına zemin hazırlar. *S. aureus*'un, gıda endüstrisinde özellikle dikkate alınmasının sebebi, çiğ süttten yüksek oranda izole edilebilmesiyle birlikte aynı zamanda ısıl işlem öncesi stafilokokal enterotoksin (SE) üretebilme özelliğine sahip olmasıdır. Bu nedenle, ürünün içerisinde yer alan mikroorganizmaların pastörizasyon öncesinde ve sonrasında düzgün bir şekilde tanımlanması, halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

2.2.1. Peynirde *S. aureus*

Doğadaki en yaygın türlerden biri olan *S. aureus*, insanda bağırsaki meme bezleri, kan, ağız, genitoüriner, üst solunum yolları, deri ve ayrıca memelilerin ve kuşların deri bezleri gibi çoğu yerde bulunabilir [Bacon ve Sofos, 2003]. Gram pozitif, hareketsiz, sporlanamayan, ayrıca katalaz ve koagülaz pozitif bir bakteri türü olan *S. aureus*, kok şekline sahiptir ve 7-48 °C aralığında optimum ise 35-40 °C aralığında üreyebilir. Oksidatif veya fermentatif şekilde glikozu metabolize edebilir ve yüksek tuz konsantrasyonları ile ısıya karşı dirençlidir. *S. aureus* türleri, zararlı toksinler (epidermolitik toksin, toksik şok sendromu toksini, stafilokokal enterotoksinler gibi süper antijenler), koagülaz ve termotabil nükleaz gibi çeşitli hücre dışı bileşikler üretebilir [Martin, 2014]. Koagülaz üretimi, *S. aureus*'un tanımlanmasında kullanılan bir belirteçtir. Ayrıca aerobik ve/veya anaerobik olarak mannitolü fermente edebilir ve bu süreçte protein A ve aseton üretebilir. Bu özellikler, ailenin diğer üyelerinde bulunmayan karakteristik özelliklerdir.

Stafilokokal hücre duvarı, bazı bakterileri yok edebilen glikozit hidrolaz tipi bir enzim olan lizozime dirençlidir. Ancak, *S. aureus*, bakteriyosin özellikleri olan lizostafine karşı ise duyarlıdır. Bu özelliği sayesinde insan ve hayvanların deri ve mukozal bölgelerinde kolonize olabilir ve hayatta kalmasına büyük avantaj sağlar. Bu nedenle üretim alanlarının temizliği ve sterilizasyonu bir kez daha önem arz etmektedir.

S. aureus, mobil genetik elementler (MGE) olarak bilinen yapıları taşıyabilen bir bakteridir. Bu MGE'ler arasında bakteriyofajlar, transpozonlar, patojenite adaları ve plazmitler bulunur. Bu elementler, *S. aureus* hücrelerinin çevresel değişikliklere yanıt verme yeteneklerini artırır ve genetik bilginin hücreler arasında transferini kolaylaştırır. Araştırmalar, *S. aureus* MGE'lerinin çeşitli antimikrobiyallere karşı direnç faktörleri kodladığını ve toksin üretimi veya konakçıya bağlanma gibi virülansın ifadesinde yer aldığını göstermiştir. Bazı *S. aureus* plazmitleri oldukça büyüktür (40-60 kb) ve bu plazmitlerle bugüne kadar ilişkilendirilen genetik ifade, muhtemelen kodlanan toplam genetik bilginin sadece küçük bir bölümünü temsil eder [Foster, 2015].

S. aureus kuru ortamlarda dahi spor oluşturmada vücut dışında uzun süre hayatta kalabilir [IFT, 2004; FDA, 2012]. *S. aureus* enfeksiyonu ve enterotoksinlerine maruz

kalındıktan sonra genellikle 2-4 saat içinde bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve bitkinlik gibi semptomlar ortaya çıkar. Stafilokokal enterotoksinler, pirojenik toksinler ailesine aittir ve süper antijenler olarak işlev görerek birçok T hücrelerini uyarırlar. Bu enterotoksinlerin etkisiz hale getirilmesi çok zordur çünkü onları etkisiz hale getirmek için gereken yüksek ısı miktarı, organizmanın zarar görmesine neden olabilir [Bacon ve Sofos, 2003].

Dünyadaki en yaygın gıda zehirlenmesine, *Staphylococcus* cinsinin bir üyesi olan *S. aureus* bakterisi neden olmaktadır ve *S. aureus* ile enterotoksinleri et ve et ürünleri, kümes hayvanları ve yumurta ürünleri, süt ve süt ürünleri, salatalar, unlu mamuller gibi çok geniş bir gıda yelpazesinde barınmaktadır [Tamarapu et al., 2001; le Loir et al., 2003; Argudín et al., 2010].

Bu yelpazenin arasında peynir üretimi, ortamın besin içeriği açısından zengin olmasından dolayı *S. aureus*'un büyümesi ve gelişmesi için oldukça uygundur. Peynir yapımında kullanılan ham maddeler, özellikle sütün içeriğinde bulunan karbonhidratlar, proteinler ve lipidler gibi önemli besin kaynakları *S. aureus*'un çoğalması için gerekli olan enerji ve besini sağlar.

Peynir yapımında kullanılan starter kültürler, laktik asit üretimine ve dolayısıyla ortamın pH'ının düşmesine neden olarak *S. aureus* suşlarının büyümesini sınırlayabilir. Ancak bazı durumlarda ise starter kültürlerin etkisi azalabilir ve bu da *S. aureus*'un büyümesini inhibe etmekte yetersiz kalacaktır.

Sütün yoğunlaştırılması işleminde su aktivitesi düşürülmesi, peynirin düşük pH değeri ve tuz içeriği de *S. aureus*'un büyümesini inhibe edebilecek faktörlerdir. Ancak tüm bu faktörlerin etkisi, peynirin türü, üretim süreci ve depolama koşulları gibi birçok değişkene bağlıdır.

Ancak gerçek üretim ortamlarında, birçok çevresel faktörün varlığı göz önüne alınmalıdır. Bu nedenle, peynir üretimi sürecinde uygun hijyen uygulamaları, sıcaklık kontrolü, pH düzenlemesi, su aktivitesi kontrolü, sütün pastörizasyon işlemi, yüksek aktiviteli başlangıç kültürü kullanımı ve peynirin paketlenme aşamasında çevrenin sanitasyonu gibi önlemler alınmalıdır. Bu önlemler, *S. aureus* suşlarının büyümesini ve enterotoksin üretimini kontrol altına alarak güvenli ve kaliteli peynir üretimini sağlayacaktır.

2.2.2. Peynirden İzole Edilen *S. aureus* Suşları ve Gıda Zehirlenmeleri

Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesi, *S. aureus* ve diğer koagülaz pozitif stafilokokların enterotoksijenik suşları tarafından üretilen stafilokokal enterotoksinlerin tüketimi sonrasında meydana gelen dünyadaki en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardan biridir [Jablonski ve Bohach, 1997].

1980'den bu yana, dünya çapında peynir tüketiminden kaynaklı 53 gıda zehirlenmesi salgını bildirilmiş ve yine bu süre zarfında yaklaşık 250.000.000 ton peynir üretilmiştir. Bu salgınlara neden olan en yaygın organizmalar *L. monocytogenes*, enteropatogenik *E. coli*, *Salmonella spp.* ve *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Ancak raporlanmış gıda kaynaklı ilk epidemik vaka yaklaşık 100 yıl önce, 1884 yılında Michigan'da Vaughan ve Sternberg tarafından yayınlanmış ve salgının peynire bulaşan stafilokoklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. 1980 yılında Kanada'da lor peyniri tüketimi sonucunda 62 kişi, 1984 yılında İskoçya'da koyun sütünden yapılan peynir tüketimi sonucunda 27 kişi, 2000 yılında Japonya'da az yağlı peynir tüketimi sonucunda 13.420 kişi, 2009 yılında Fransa'da çiğ süttten yapılan peynir tüketimi sonucunda 23 kişi ve 2014 yılında İsviçre'de bir yatılı okulda tomme (çiğ inek sütünden yapılan yumuşak peynir) tüketimi sonucunda 13 kişi gıda zehirlenmesi yaşamıştır ve bu vakaların hepsinin *S. aureus* kaynaklı gıda zehirlenmesi olduğu saptanmıştır [Todd et al., 1981; Bone et al., 1989; Asao et al., 2003; Ostyn et al., 2010; Johler et al., 2015].

Staphylococcus kaynaklı gıda zehirlenmeleri için birçok koşul gereklidir. İlk olarak, gıda veya bileşenlerinin enterotoksijenik bir *Staphylococcus spp.* suşu ile kontamine olması gereklidir. Dolayısıyla ham maddelerin, sağlıklı veya enfekte taşıyıcıların veya diğer kaynakların bu bakteri suşunu içermesi demektir. İkinci olarak, stafilokokların kaynaktan gıdaya transferi gerçekleşmelidir. Bu, hijyen uygulamalarının yetersiz olması veya zaten kontamine olmuş ekipmanların kullanılması gibi faktörlerle mümkün olabilmektedir.

Üçüncü olarak *S. aureus*'un büyümesi ve enterotoksin üretimi için uygun fizikokimyasal özelliklere sahip gıda bileşimi de önemli bir etmendir. Bu da, uygun besin maddelerinin bulunduğu ve uygun pH, su aktivitesi ile sıcaklık gibi faktörlerin sağlandığı bir ortam anlamına gelmektedir. Dördüncü olarak, stafilokokların büyümesi ve toksin üretimi için yeterli süre ve sıcaklık koşullarının sağlanması gerekmektedir.

Bu süre ve sıcaklıkta, stafilokokların hızla çoğalabileceği ve toksinlerin birikimine yol açabileceği optimum koşullar sağlanmalıdır.

Son olarak ise, semptomların tetiklenmesi için yeterli miktarda toksin içeren gıdanın tüketilmesi gerekmektedir. *Staphylococcus enteretoksinleri* sıcaklığa dayanıklı olduklarından yiyecekler pişirildiğinde veya işlendiğinde genellikle inaktif hale gelmezler. Bu nedenle, kontamine gıdaların tüketilmesi bireylerin semptomlarını tetikleyebilir [Pereira et al., 1996; Asao et al., 2003].

Çoğu stafilokok gıda zehirlenmesi salgını gıda ürününün işlenmesi, pişirilmesi ve dağıtılması sırasındaki kötü hijyen uygulamalarından kaynaklanır. Ayrıca, kontaminasyondan sonra gıdaların yetersiz soğutulması da *Staphylococcus* suşlarının büyümesini ve üremesini teşvik ederek toksik üretimini uyarıp gıda zehirlenmesine neden olabilir [Barber, 1914]. Bu nedenle, stafilokok gıda zehirlenmesini önlemek için hijyenik üretim, uygun sıcaklık kontrolü, hijyenik işleme ve depolama yöntemleri gibi önlemler alınmalıdır. Ayrıca, gıda endüstrisinde çalışan personelin eğitimi ve bilinçlendirilmesi de büyük önem taşımaktadır.

2.2.3. Peynirde *Listeria spp.* ve *L. monocytogenes*

Listeria cinsi, düşük G-C içeriğinden dolayı gram-pozitif bakterilerin Clostridium alt dalında sınıflandırılır. Bu cinsin tanınmış türleri *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'dir. Bu türlerden *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* memelilerde patojen olarak kabul edilir [Rocourt et al., 1986; Cummins et al., 1994].

L. monocytogenes, nemli ortamlar, toprak, su, çürümüş bitki örtüsü ve hayvanlar gibi çok geniş bir skalada bulunabilen ve soğutma ve/veya diğer standart gıda koruma önlemleri altında hayatta kalabilen ve büyüyüp çoğalabilen patojenik bir bakteri türüdür. *Listeria spp.*, spor oluşturmayan, gram-pozitif, küçük ve çubuk şeklinde organizmalardır. Boyutları genellikle 0.5-4 µm çapında ve 0.5-2 µm uzunluğundadır.

Bu bakteriler fakültatif anaerobiktir, yani hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda yaşayabilirler, yüksek tuz konsantrasyonlarının varlığında gelişebilir olarak (%10 (w/v) NaCl'ye kadar) çeşitli gıda paketleme koşullarını tolere edebilirler [Panfill-Kuncewicz et al., 2009]. Ayrıca katalaz reaksiyonları pozitif ve oksidaz reaksiyonları negatif sonuç vermektedir. *Listeria spp.*, peritrik kamçısı sayesinde 20-25 °C sıcaklıkta

hareket edebilir. *L. monocytogenes*'in, somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerine dayalı olarak serotipleri sınıflandırılmıştır. Sınıflandırılan 13 farklı serotipin arasında 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 bulunmaktadır [Meloni, 2014]. Bu serotipler, *L. monocytogenes*'in genetik özelliklerini ve potansiyel hastalık yapma yeteneklerini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Optimum büyüme sıcaklığı 30-37 °C olan *L. monocytogenes*, 0-45 °C arasında da hayatta kalabilmektedir. 0.92 gibi düşük su aktivitesinde ve pH 4.0-9.5 aralığında yaşamını sürdürebilmektedir [Carpentier ve Cerf, 2011; Lianou ve Koutsoumanis, 2013]. *L. monocytogenes* buzdolabı sıcaklığında da yaşamının yanı sıra çoğalabilir, birçok dezenfektana karşı dayanıklıdır. Ayrıca çeşitli yüzeylere yapışabilmektedir. Bu koşullar *L. monocytogenes*'i eşsiz kılmakla birlikte kendisine işleme tesislerine bulaştıktan sonra uzun süre hayatta kalabilme fırsatını sağlamaktadır [Meloni, 2014].

L. monocytogenes genellikle gıda ürünlerinin hasat edildiği, işlendiği, hazırlandığı, paketlenildiği, taşındığı veya depolandığı yani kısacası gıdanın temas halinde bulunduğu her yerden bulaşabilir çünkü bu ortamlar ham maddeler, su, toprak ve hava yoluyla kirlenmeye müsaittir. Ayrıca, evcil hayvanlar da *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş yiyecekleri tükettikleri takdirde ev ortamında bakterileri yayabilirler. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş yiyecekleri tüketen insanlarda listeriosis adı verilen bir hastalık ortaya çıkar.

L. monocytogenes ile kontamine olmuş yiyecekleri tüketen insanlarda listeriosis adı verilen bir hastalık gelişebilir ve bu hastalık genellikle altta bağışıklık sistemini etkileyen bir hastalık yatan kişileri etkiler. Bunlar kanser veya AIDS gibi hastalıklar olabilir. Ayrıca, yaşlılar, hamile kadınlar, yeni doğan bebekler veya fetüsler gibi diğer duyarlı bireyleri de etkiler. Hastalığın semptomları grip benzeri olabilir, ancak ciddi komplikasyonlara yol açabilen menenjit, sepsisemi, spontan düşük veya yenidoğanlarda listeriozisi gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir [Wing ve Gregory, 2000]. Listeriosis insidansı, diğer gıda kaynaklı hastalıklara kıyasla daha düşük olmasına rağmen, ilişkili hastaneye yatış oranı %94 iken ölüm oranı yaklaşık %30 gibi yüksek bir orandır [Schlech, 1988; Wing ve Gregory, 2000; Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, 2011; Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi, 2013].

Listeriosis'in gıda kaynaklı bir hastalık olarak tanınmasının ardından son 30 yılda dünyanın dört bir yanından, özellikle de Avrupa'dan, birçok listeriosis salgını ve

sporadik vaka rapor edilmiştir. Bu hastalığın bulaşmasında çeşitli gıda grupları yer alsa da özellikle süt ürünleri ve peynirler ön plana çıkmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Farklı peynir türleri ile ilişkili bildirilen listeriosis salgınları [Swaminathan, ve Gerner-Smidt, 2007].

Yıl	Konum	Vaka Sayısı	Ölüm Sayısı	Şüphelenilen/Tespit Edilen Gıda	Referans
1985	ABD	142	48	Meksika usulü peynir	Linnan ve diğ., 1988
1990	Danimarka	26	7	Mavi küflü peynir	Jensen ve diğ., 1994
1995	Fransa	37	11	Yumuşacık peynir	Vaillant ve diğ., 1998
2001	Japonya	19	0	Peynir	Makino ve diğ., 2005
2002	Kanada	17	0	Çiğ süttten yapılmış yumuşak peynir	Gaulin ve diğ., 2003
2006	Almanya	189	26	Yumuşak peynir	Koch ve diğ., 2010
2007	Norveç	17	3	Camembert peyniri	Johnsen ve diğ., 2010
2009	Avusturya	34	8	Acid curd peyniri	Fretz ve diğ., 2010; Schoder ve diğ., 2013
2012	ABD	22	4	Ricotta peyniri	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, 2012

Avrupa ülkelerinde bildirilen listeriosis vakalarının yıllık insidansı 0.3 ila 7.5 vaka/milyon kişi arasında değişebilmektedir. *L. monocytogenes*'in süt endüstrisi için ciddi bir tehdit olduğu 1985 yılında ortaya çıkmıştır. Özellikle Meksika tarzı peynir tüketimiyle ilişkili büyük bir salgın Güney Kaliforniya'da izlenmiştir [Swaminathan ve Gerner-Smitt, 2007]. Süt ürünleri, hem invaziv hem de invaziv olmayan listeriosis

ile ilişkilidir ve serovar 4b, salgın izolatlarının çoğunu temsil etmektedir. Avrupa’da *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş süt ürünleri, tüm gıda ürünlerinin neden olduğu listeriosis salgınlarının yaklaşık yarısından sorumludur [Chikhi et al., 2024].

Son zamanlarda pastörize süttten hazırlanan peynirle ilişkili bir dizi listeriosis salgını bildirilmiştir [Gaulin et al., 2008; Koch et al., 2010; Gould et al., 2014]. Little ve arkadaşları 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada satışa sunulan pastörize sütle yapılmış peynirlerin %2.5’inde *Listeria spp.* (*L. monocytogenes* dahil) bulduklarını raporlarlarken, çiğ ve pastörize olmuş süttten yapılmış peynirlerin %2’sinde Avrupa Komisyonu 2004/24/EC tarafından belirlenen limitlerin üzerinde *Listeria spp.* saptadıklarını belirtmişlerdir.

Dünya çapında hızla artan sağlıklı beslenme kültürü, herhangi bir ısıtım işlem aşamasına tabi tutulmadan üretilen peynirlerin tüketimini de artırmıştır. Ancak peynirlerin tüketimden önce herhangi bir ısıtım işlemine tabi tutulmadıkları gibi genellikle soğutma sıcaklıklarında muhafaza edildikleri unutulmamalıdır. Bu durum, psikrotrofik bakterilerin ve özellikle *L. monocytogenes*’in yaşamasına ve çoğalmasına olanak sağlamaktadır. Çiğ süttün pastörizasyonu, *L. monocytogenes* tarafından süt ürünleri kontaminasyonu riskini ortadan kaldırmaz. Bu konuda yapılan araştırmalar, pastörize süttten elde edilen ürünlerin bile *L. monocytogenes* kontaminasyonuna maruz kalabileceğini göstermektedir [Oliver et al., 2005; Gould et al., 2014]. Örneğin, 1998-99 yıllarında Finlandiya’da ve 2006 yılında Almanya’da yaşanan salgınlar, pastörize süttten yapılan peynirin *L. monocytogenes* kontaminasyonuna maruz kaldığını açıkça göstermiştir. Bu salgınlar, *L. monocytogenes*’in süt ürünleri işleme sürecinin sonraki aşamalarında kontaminasyonun gerçekleşebileceğinin birer kanıtı olmuştur [Le et al., 2014]. Bu nedenle, süt ürünleri endüstrisinde hijyenik uygulamaların ve kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik önlemlerin büyük önem taşıdığı vurgulanmalıdır.

2.2.4. Peynirden İzole Edilen *L. monocytogenes* suşları ve Gıda Zehirlenmeleri

L. monocytogenes’in peynirde hayatta kalması ve çoğalması, peynirin üretimine, olgunlaşma sürecine, başlatıcı kültürlerle, salamura solüsyonlarına, drenaj sistemlerine, kullanılan ekipmanlara ve depolama koşullarına bağlıdır. Bu koşullar, bakterinin

büyümesi için uygun ortam sağlayabilir veya büyümesini engelleyebilir [Schoder et al., 2012; Abdullah ve Çalıcıoğlu, 2013].

Üretim aşamasında çiğ sütün tercih edilmesi veya pastörizasyon işleminin yetersiz uygulanması, *L. monocytogenes*'in peynire bulaşma riskini artıracaktır. Süt katıları ve yiyecek artıklarının bulunduğu ıslak yüzeyler, patojenin biyofilm oluşturmaya olanak tanımaktadır. Ayrıca, peynir üretim sırasında hijyenik uygulamaların yetersiz olması, bakterinin çoğalma potansiyelini artıran önemli bir faktördür [Wemmenhove et al., 2013].

Olgunlaşma süreci, peynirin tadının oluştuğu ve tekstürünün geliştiği bir aşamadır. Bu süreçte, peynirin sıcaklık ve nem koşulları, peynirdeki asit ve tuz içeriği *L. monocytogenes*'in büyümesi için uygun bir ortam sağlayabilir. Özellikle soğutma sıcaklıkları gibi düşük sıcaklıklarda ve peynirin içerdiği su aktivitesine bağlı olarak yüksek nemde bakterinin çoğalması ve hayatta kalması mümkündür [Gnanou et al., 2000].

Depolama süreci, peynirin raf ömrü boyunca saklandığı aşamadır. Depolama koşullarında uygun sıcaklık ve nem seviyeleri korunduğu takdirde bakterinin büyümesi sınırlanabilmektedir. Ancak, bu durumun tam tersi söz konusu olduğunda ise *L. monocytogenes* üremesi kaçınılmazdır [Gnanou et al., 2000].

Örneğin, yumuşak peynirlerin pH değeri 4.5-6.5 aralığında, NaCl içeriği %2.3-3.5 aralığında (w/w) olarak değişmektedir [Pintado et al., 2005]. Peynirin karakteristik özelliklerinden olan pH ve tuz içeriği, *L. monocytogenes* için hayatta kalma koşullarını oluşturabilmektedir, çünkü bunlar *L. monocytogenes* için daha şiddetli pH ve tuz koşullarına toleransı indükleyebilen ölümcül olmayan koşulları temsil etmektedir [Skandamis et al., 2012].

Bu nedenle, geleneksel peynir koruma yöntemleri *L. monocytogenes*'in hayatta kalmasını önlemede başarısız kalacak, virulansını da artıracaktır. Peynir üretiminde hijyenik uygulamaların titizlikle uygulanması, çiğ sütün uygun şekilde işlenmesi ve/veya pastörizasyonunun doğru şekilde uygulanması, uygun sıcaklık ve nem koşullarının sağlanması gibi önlemler *L. monocytogenes*'in peynirde hayatta kalmasını ve çoğalmasını azaltmaya yardımcı olacaktır.

2.3. Biyofilm

Bakteri kolonileri uygun koşullarda üreyerek ve çeşitli yüzeylere yapışarak biyofilm tabakalarını oluşturmaktadırlar. Biyofilm polisakkaritler, nükleik asitler, lipidler ve bakterilerin büyüme esnasında salgıladıkları proteinler gibi maddeleri içeren hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşmaktadır. Matris, çoğunlukla mikroorganizmaların kendileri tarafından üretilen ve biyofilm hücrelerinin içine gömüldüğü hücre dışı malzemeyi ifade etmektedir. EPS, mikroorganizmaların türüne, sıcaklığa ve besin kaynaklarının mevcudiyetine gibi birçok etmene bağlı olarak biyofilm tabakaları arasında büyük farklılıklar gösterebilir. Biyofilm yapısındaki EPS'ler bakterilere çok çeşitli avantajlar sunmaktadır. Biyofilm matrisine dahil olan polisakkaritler, nükleik asitler ve lipidler biyofilm yapısına mekanik stabilite sağlarken, hücreler arası üç boyutlu bir polimer ağ oluşturur [Flemming ve Wingender, 2010]. Bu kompleks yapıdaki matriks, mikroorganizmaların özellikle olumsuz koşullardan korunmasına sebep olurken aynı zamanda ortamdaki mikrobiyal rekabet gücünü artırarak bazı hücresel işlevlerin gerçekleştirilmesini de sağlamaktadır.

Biyofilm matrisi, birçok farklı elementi içeriyor oluşu nedeni ile bakteriler için dinamik bir yaşam tarzı inşa etmektedir. Sonuçta ortaya çıkmakta olan bu dinamik yaşam tarzı hücreler arası iletişim, yatay gen transferi, sinerjistik mikro konsorsiyum oluşumu dahil olmak üzere birçok yoğun etkileşimin meydana gelmesine fırsat tanır.

Endüstriyel mikrobiyal uygulamalarda atık suların temizlenmesi ve toprak ile suyun biyoremediasyonu gibi alanlarda bakteriyel biyofilmler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak, biyofilmler, çok çeşitli endüstri alanlarında ciddi sorunlara neden olabilmektedirler. Örneğin, biyofilmler petrol sahası boru hatlarında korozyonun mikrobiyal olarak indüklenmesi, boruların tıkanmasına, gemi gövdelerinin ve üretim hatlarının kirlenmesine sebep olabilmektedir. Bu durumlarda biyosit üreticileri, biyofilm oluşumunu ve ilerlemesini kontrol altına alabilmek adına temizlik prosedürlerini geliştirirler. Ancak, biyofilm oluşumlarını tamamen ortadan kaldırılması mümkün değildir. Dolayısıyla, biyofilm oluşumunu kontrol altına alabilmek için rutin temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri şarttır.

2.3.1. Biyofilm Oluşum Modeli

Çok sayıda çalışma biyofilm oluşumunun tek, serbest yüzen planktonik formdaki bakterilerin ilk yüzeye bağlanmasıyla başladığını ve tüm süreç boyunca ifade edilen genler ile proteinlerin planktonik formdan farklılık gösterdiğini, dolayısıyla bu oluşumun çok aşamalı ve karmaşık bir süreç olduğu fikrini desteklemektedir. Tüm süreç, pH, sıcaklık, sinyal molekülleri, yüzeylerin doğası, Brown hareketleri ve hidrodinamik kuvvetler gibi birçok farklı dış koşuldan etkilenebilmektedir [Zhao et al., 2017]. Araştırmacılar, biyofilm çalışmaları boyunca yaptıkları mikroskopik gözlemler sonucu farklı fizyolojik özellikleri göz önünde bulundurarak biyofilm oluşum sürecini 4 ana aşamaya ayırmışlardır [Characklis, 1973; Davey ve O'Toole, 2000; Petrova et al., 2017]. Bu aşamalar, yüzeye tutunma (geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz), mikrobiyal büyüme, olgunlaşma ve ayrılma.

Biyofilm oluşumunun başlangıç noktası genellikle planktonik mikroorganizmaların etraftaki yüzeylere tutunmasıdır. Bu tutunma, serbest yüzen mikroorganizmaların bir araya toplanarak birbirine ve yüzeye bağlanmasını ifade etmektedir. Başlangıç olarak kabul edilen bu aşama, biyofilm oluşumunun ilk adımını ve temel unsurunu oluşturmaktadır ve genellikle diğer aşamaların gerçekleşebilmesi için bir gerekliliktir.

Yüzeye tutunmanın ilk aşamasında, mikroorganizmalar yüzeylere geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır ve bu aşamanın karakterizasyonu, yüzeylere polar olarak bağlanan mikroorganizmaların varlığı ile sağlanır [Banerjee et al., 2015].

Bu süreçte, hücre içi sinyal moleküllerinden biri olan bis-(3'-5')-siklik dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP) üretimi gerçekleşir. Yüzeye tutunma sayesinde mikroorganizmalar bir arada kalarak biyofilm matrisini oluştururlar ve matris sayesinde mikroorganizmalar birbirleriyle etkileşimde bulunabilir, besinlerini paylaşabilir, sinyal iletişimini sağlayabilir ve biyofilm yapılarını oluşturmayı başarabilirler. Bu nedenle, yüzeye tutunma biyofilm oluşumunda kritik bir aşamayı temsil etmektedir ve biyofilm topluluklarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Yüzeylere başarılı bir şekilde tutunan mikroorganizmalar, ortamdaki yüksek c-di-GMP varlığında mikrokoloni oluşumuna yol açan EPS içinde çoğalmaya başlarlar. Bu süreçte, flagella ve tip IV pili ile bakteri hücrelerinin hareketleri, yüzeyler arasındaki etkileşimler ve hücre-hücre agregasyonları önemli bir rol oynamaktadır [Rabin et al., 2015].

Olgunlaşma sürecinde EPS, mikrobiyal tutunmanın üç boyutlu yapısının stabilizasyonunu sağlar, hücreleri gruplandırarak onlara çeşitli streslere (antimikrobiyaller, oksidatif hasar, metal katyonları vb.) karşı koruma sağlar. EPS ayrıca metabolik ürünler ve enzimler için gerekli olan sinyal moleküllerini de kapsülleyebilmektedir [Toyofuku et al., 2016].

Olgun bir biyofilm, 3 katmanlı bir yapıya sahiptir: iç (düzenleyici) katman, orta (mikrobiyal temel) katman, dış (biyofilm dışında mikroorganizmaların bulunduğu) katman [Zhao et al., 2017]. Olgun biyofilm yapısı, mantar ya da kule şeklinde bir yapı oluşturabilmektedir [Rabin et al., 2015].

Yeni bir biyofilm döngüsünü başlatmak üzere olgunlaşan biyofilm, mikroorganizmalarını etrafa dağıtmalıdır. Bu dağılım, hareket ve EPS bozulmasına bağlı olarak aktif veya sıvı akışı gibi fiziksel faktörlere bağlı olarak pasif olabilir. Ayrılma sürecinde genellikle aşırı artmış nüfus yoğunluğu, yoğun rekabet, yetersiz besin kaynağı gibi faktörler rol almaktadır [Rabin et al., 2015].

2.4. *S. aureus* Suşları ile Biyofilm Oluşumu

S. aureus planktonik hücreleri yüzeye tutunma aşamasında konakçı ile etkileşimi desteklemek için çeşitli faktörler ve düzenleyici mekanizmalar kullanmaktadır. Konakçı hücreye tutunma yeteneğinde rol alan moleküller arasında, fibronektin bağlayıcı proteinler (FnBPlar), fibrinojen bağlayıcı protein (Fib), kümelenme faktörleri (ClfA, ClfB) ve kümelenme faktörlerini çieren yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMM), serin-aspartat tekrar aile proteinleri (SdrC, SdrD ve SdrE) bulunmaktadır [Wolz et al., 2002; Sabat et al., 2006; O'Neill et al., 2008]. Tüm bu bileşenler, *S. aureus*'un yüzeye tutunma yeteneğini sağlayarak biyofilm oluşturma sürecinde önemli bir rol almaktadırlar.

Yeterli enerji kaynağı varlığında bakteriler bölünmeye ve birikmeye başlarlar. Bu aşamada, hücre içi sinyal moleküllerini tetikleyen çevresel sinyaller ile biyofilm oluşumu düzenlenir. Bu sinyalleri alan bakteriler, biyofilm oluşturmak üzere çoğalmaya devam eder [Mangwani et al., 2016]. Oluşan biyofilm matrisi, antibiyotiklerin biyofilm içerisindeki mikroorganizmalara ulaşmasını engelleyebilir. [Otto, 2008].

Olgunlaşma sırasında daha organize bir yapıya sahip olan biyofilm (kule veya mantar şekli), derin tabakalarına besin taşınması için mikrokolonilerin etrafında küçük kanallar oluşturur. Olgun olan biyofilm yapıları içerdiği özgün metabolik yapılar sayesinde stres etkenlerine karşı direnç sağlar [Gupta et al., 2016].

EPS varlığı sayesinde biyofilm yapılarının temel birimlerini oluşturmak üzere mikrokoloniler oluşturulur. Bu oluşumdan sonra, genetik düzenlemeler ve dış faktörler yardımı ile biyofilm kalınlaşmaya ve ayrılmaya devam eder.

Ayrılma sırasında EPS'lerin parçalanması için ekzoenzimler ve yüzey aktif maddeler üretilir [Lister et al., 2014]. Ayrılan bakteriler ise planktonik hücreleri oluşturur ve oluşan hücreler diğer bölgelere kolonize edilebilmek üzere programlanır. Amfifilik α -sarmal ikincil yapıya sahip olmasından dolayı yüzey aktif madde benzeri özellikler gösteren yüzeyde çözünebilen fenolik modüller (PSMler), biyofilm yapılarının dağılmasında ve yayılmasında rol alan etkili moleküllerdir. Bu sayede biyofilm matrisindeki kovalent olmayan bağları kırarak, besin maddelerinin tabakanın daha derinine taşınabilmesi için gerekli kanalları oluşturur ve biyofilm yapılarının daha uzak bölgelere yayılabilmesi için gerekli yıkıcı etkiyi sağlar [Cheung et al., 2014]. *S. aureus* hem çözünür formda hem de amiloid lif şeklinde birleşmiş PSMlere sahiptir. *S. aureus*'un α -PSM'lerin fibril üretiminde önemli rol oynayan ana amiloid proteinleri α -PSM1 ve α -PSM4 peptitleridir [Marinelli et al., 2016].

2.4.1. *S. aureus* suşları ile Biyofilm Oluşum Mekanizmaları

2.4.1.1 Polisakkarit Intersellüler Adezin (PIA)-Bağımlı Mekanizma

Katyonik olarak yüzeye tutunma ile mikrobiyal bölünme adımlarında önemli bir rol oynayan polisakkarit intersellüler adhesin (PIA), *S. aureus*'un biyofilm oluşumunda etkili olan bir polimerik moleküldür [Nguyen et al., 2020]. PIA üretimi *icaADBC* operonu tarafından kodlanan proteinler ile sağlanır ve bu sayede *S.aureus* suşlarında biyofilm oluşumu kontrol edilir. *icaADBC* operonunda rol alan genler ve ürünleri Tablo 2.2.'de verilmiştir. Bu mekanizmada, biyofilm oluşumunun temel düzenlenmesinde *icaA* ve *icaD* genleri esastır. [Brooks and Jefferson, 2014].

Tablo 2.2.: *icaADBC* operonu tarafından kodlanan genler ve genlerin ürünleri.

Gen	Ürün
<i>icaA</i>	N-asetilamino-glukozamin transferaz
<i>icaB</i>	Olgun PIA'nın deasetilasyonunu katalize eden bir deasetilaz enzimi
<i>icaC</i>	Transmembran protein Yeni sentezlenen PIA'nın hücre yüzeyine transferine aracılık eder.
<i>icaD</i>	<i>icaA</i> 'nın şaperon proteinini. Bu sayede, <i>icaA</i> polimerlere özgüllük kazanır.

2.4.1.2 Protein-Bağımlı Mekanizma

Cucarella ve ekibi, 2004 yılında yayınlamış oldukları çalışmada *ica* operonu olmayan suşların da biyofilm oluşturabilme kabiliyetlerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu durum, biyofilm oluşumunda *ica* operonu dışında başka mekanizmaların da yer aldığını ve dolayısıyla biyofilm oluşumunun daha geniş ve karmaşık bir süreç olduğunu göstermektedir.

S. aureus 2276 amino asit içeren bir protein olan Bap proteinini (biofilm-associated protein) kodlar ve *Bap* genine sahip olan tüm *S. aureus* suşlarının yüksek tutunma ve güçlü bir biyofilm oluşturma kapasitesi oldukları tespit edilmiştir ki bu da Bap proteinini varlığının abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği ile güçlü bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir [Salina et al., 2024].

2.4.1.3 Hücre Dışı DNA (eDNA) Bağımlı Mekanizma

Olgun *S. aureus* biyofilmi, dışarıdan eklenen DNase 1'e karşı hassastır ve bu durum eDNA'nın biyofilm matrisinin bir yapısal bileşeni olduğunu gösterir [Mann et al., 2009]. eDNA, biyofilm yapısının stabilitesini sağlamak amacıyla PIA ve biyofilmle ilişkili diğer proteinlere bağlanabilmektedir [Blakeman, 2019].

2.4.2. *S. aureus* suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Regülasyonu

Quorum-sensing mekanizması, bakterilerin ortamdaki diğer bakterileri popülasyonlarının sayısındaki değişiklikleri belirlemeleri için belirli sinyal moleküllerinin görev aldığı bir hücreler arası sinyal iletim mekanizmasıdır. Bu sinyal molekülleri belirli bir eşiğe ulaştığı anda, bakterilerde ilgili genlerin ifadesi başlatılır.

S. aureus için quorum-sensing mekanizması iki faktör içermektedir: Agr (accessory gene regulator) sistemi ve LuxS/AI2 (autoinducer-2) sistemi. Agr sistemi sayesinde RNA-3 transkripsiyonu düzenlenerek bakteriyel biyofilm oluşumu ayrılırken; LuxS/AI2 sistemi sayesinde ise PIA ifadesi azaltılmış olur [Le ve Otto, 2015].

2.5. *L. monocytogenes* suşları ile Biyofilm Oluşumu

L. monocytogenes biyofilmlerinin oluşumunda esas olarak lipoteikoik asit görev alır ve oluşan biyofilmler çelik, kauçuk, propilen ve cam yüzeylerde gelişebilir [Silva et al., 2008]. Biyofilm oluşumundaki bir diğer esas unsur ise *L. monocytogenes* suşunun flagellar hareketliliğidir. Biyofilm oluşumunda etkili olan genlerde düzenleyici gen olan phoR ve D-Alanin'in lipoteikoik asit içine dahil edilmesinde yer alan genler bulunmaktadır [Alonso et al., 2014]. D-Alanin'in lipoteikoik aside dahil edilmesi hücre yüzeyinin özelliklerini değiştirebilir ve bu şekilde biyofilm oluşumu tetiklenebilir. Bu genlerin aktivitesi, biyofilm oluşumu için gereken çevresel koşullara bir yanıt olarak düzenlenir.

L. monocytogenes biyofilmlerinin yüzeye tutunma mekanizması hidrofobik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, flagella hareketliliği, elektrostatik kuvvetler, fibril ve ekzopolisakkarit gibi bir dizi farklı faktörün etkileşimine bağlıdır. Bu faktörler arasından özellikle elektrostatik olan itme kuvvetleri, bakterinin substratın spesifik bağlanma bölgesine karşı olan hareketini artırabilmektedir [Chae ve Schraft, 2000]. Aynı zamanda, *L. monocytogenes* tarafından biyofilm üretimi ve üretilen biyofilmin yüzeye tutunması çeşitli çevresel faktörlere karşı çok daha hassastır [Tresse et al., 2006].

L. monocytogenes'in oluşturacağı biyofilmlerde de EPS önemli rol oynamaktadır. *L. monocytogenes* tarafından üretilen EPS, biyofilm olgunlaşmasında önemli bir faktör olan nükleik asitler, eDNA ve proteinlerden oluşmaktadır [Winkelstroter ve Martinis, 2015]. eDNA sayesinde mikroorganizmalar farklı yüzeylere tutunarak oraya ilk

yapışma olayını başlatır ve tutundukları yüzeyde toplanarak asit-baz etkileşimleri başlamaktadır [da Silve ve de Martini, 2013].

2.5.1. *L. monocytogenes* suşları ile Biyofilm Oluşum Mekanizmaları

Listeria spp. ve *monocytogenes* biyofilm oluşumuna geri dönüşümlü tutunma ile başlar. Van der Waals kuvvetleri ve yerçekimi ile elektrostatik kuvvetler yardımı ile yüzeyden belirli bir mesafede bulunan hücreler ile etkileşime girer. Bu aşamada flagella hareketleri büyük önem arz etmektedir [Van Houdt ve Michiels, 2010].

Bir sonraki aşamasında ise hücre yüzeyine daha az mesafeden hücre yüzeyi ile geri dönüşümsüz tutunma yoluyla daha güçlü etkileşimler kurar [Kolwzan, 2011]. Bu aşamada hücre yüzeyinde ortaya çıkan adezinler hücrenin yüzeye yapışmasını ve tutunmasını mümkün kılar [Monds ve O'Tool, 2009]. Bu süreçte, biyofilmi çevreleyen EPSlerin salınımı da eşlik eder. EPS, biyofilmi koruyan ve yapılandıran bir matris görevi görür [Czaczyk ve Myszka, 2007].

Olgunlaşma aşamasında ise mikro koloniler oluşarak biyofilm hacmi artar [Myszka ve Czaczyk, 2011].

Son aşama olan ayrılmada ise ortamda çok yoğun bir tabaka oluşması sonucu hücre-hücre iletişimi sayesinde hücreler ortamdan göç eder [Kolenbrander et al., 2022].

L. monocytogenes için biyofilm sürecinde flagella, biyofilme ilişkili proteinler, SecA2, hücreler arası iletişim ve eDNA gibi faktörler önemli bir rol oynamaktadırlar (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3.: *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumundaki moleküler belirleyiciler [Kocot ve Olszewska, 2017].

Faktör	Biyofilm Oluşumundaki Rolü	Referans
Flagella	Yüzeye tutunma	Vatanyoopaisarn et al., 2000
PfrA	Virölans faktörü ve flagella biyosentezinin düzenleyicisi	Lemon et al., 2010
LuxS	Otoindüktör Ai-2 molekülündeki dönüşümle biyofilm oluşumunun inhibisyonu	Challan Belval et al., 2006
agrA	Biyofilm oluşumunun erken aşamalarının yapışması ve düzenlenmesi	Rieu et al., 2007
relA	Açlık tepkilerinin düzenlenmesi	Taylor et al., 2002
hpt		
SecA2	İnaktivasyon ve hücre agregasyonunu teşvik ederek, biyofilm oluşumunun indüklenmesi	Renier et al., 2014
BapL	Hücre bağlanması için gerekli olan biyofilm ile ilişkili protein	Jordan et al., 2008

2.6. *S.aureus* ve *L. monocytogenes* suşlarının Oluşturdukları Biyofilmlerin Gıda Endüstrisindeki Önemi

Kontaminasyon kaynağı olarak hizmet edebilen patojenik biyofilmler, gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde yaşayabilmekte ve çoğalabilmektedirler. Bu sayede gıda tesislerinde mikrobiyal kontaminasyon riski artarken bu durum gıda ürünlerinin kontaminasyonundan kaynaklanacak hastalıkların ana nedenlerinden birisi haline gelecektir. Bu sebeplerden dolayı gıda işleme tesislerinde ve ortamlarında temizlik ve sanitasyon işlemleri ile bu işlemlerin kontrol sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Gıda kalitesi ve güvenliğini kontrol etmek için Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) ve İyi Üretim Uygulamaları gibi bir dizi yöntem oluşturulmuştur. Bunlara ek olarak süt ürünleri işleme noktalarında Yerde Temizlik (CIP) prosedürleri uygulanmaktadır [Kumar ve Anand, 1998]. Bu prosedürler, biyofilmsiz

bir üretim hattı oluşturmak için fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar kullanmaktadır. Ancak, en etkili prosedürlerden biri olan CIP prosedürü dahi bazı durumlarda tam olarak etkili olmayabilir ve ortamda kalan mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilmektedir [Dunsmore, 1981].

Patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmlerin ortamdan bertarafı sırasında bu biyofilmlerin temizleyicilere karşı direnç geliştirebildikleri gözlemlenmiştir. Bu biyofilmler temizlik prosedürlerini manipüle etmekle kalmayıp, ısı transferini azaltarak veya korozyon oluşumuna sebep olarak bazı ekipmanların çalışma verimini azaltabilmektedir.

Gibson ve ekibinin 1999 senesinde yayınlamış oldukları çalışmalarında biri alkali biri asidik olmak üzere iki farklı ticari dezenfektanın *S. aureus*'a karşı etkili olmadığını belirlenmiştir.

Luppens ve ekibi, *S. aureus* tarafından üretilen biyofilmlerin temizlenmesi için standardize edilmiş dezenfektanları, Avrupa dezenfektan testinde (EN 1040) kullanılan koşulları taklit ederek test etmişlerdir. Cam, paslanmaz çelik ve polistiren üzerindeki *S. aureus* biyofilmlerinin giderimi için benzalkonyum ve sodyum hipoklorit dezenfektanlarının olması gereken konsantrasyonunu araştırmışlardır. Sonuçlar dezenfektan aktif bileşiklerinin Avrupa faz 1 süspansiyon öldürme seviyesini elde etmek için gereken konsantrasyonlardan benzalkonyum için 50 ve hipoklorit için 600 kat daha fazla olması gerektiğini göstermiştir [Luppens et al., 2002].

2014 senesinde yayınlanmış olan bir çalışmanın raporuna göre polipropilen ve paslanmaz çelik yüzeylere tutunmuş olan, *S. aureus* tarafından üretilmiş olduğu biyofilmler perasetik asit ve sodyum hipoklorit muamelelerine karşı direnç göstererek ortamdan uzaklaşmamıştır [Souza et al., 2014].

Pan ve ekibinin 2006 senesinde yayınlamış oldukları çalışmalarında ise *L. monocytogenes*'in ortadan kaldırılması için ticari bir hidrojen peroksit bazlı temizleyicinin yetersiz olduğu, hatta daha yaygın kullanılan kuartarner amonyum bileşikleri içeren dezenfektanlara karşı ise daha fazla direnç geliştirdiklerini ifade etmişlerdir [Pan et al., 2006].

Karışık tür biyofilmlerde laktik asit bakterileri gibi eşlikçi suşların ortamda bulunmasının *L. monocytogenes*'e karşı koruyucu bir etki gösterdiği ve asidik

dezenfektanlara karşı toleransı artırdığı tespit edilmiştir [Van der Veen ve Abee, 2011].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, kullanılan dezenfektanların biyofilm tabakalarını tamamen etkili bir şekilde ortadan kaldırmada sınırlı olduğunu ve birçok yüzeyde yeterince etkili olamadıklarını göstermektedir. Aynı zamanda bu çalışmaların bulguları neticesinde biyofilm oluşumunu engellemek ve kontrol altına almak için etkili yöntemlerin geliştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır.

2.7. *S. aureus* ve *L. monocytogenes* Suşlarının Oluşturdukları Biyofilmler ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

S. aureus, biyofilm oluşturma yeteneği sebebi ile hastaneler gibi sağlık ortamlarında büyük bir tehdit oluşturan bir patojen bakteridir. Biyofilm oluşturan *S. aureus* suşları, kateter, protez, yapay kalp kapakları gibi yüzeylere yapışarak koloni oluşturabilmektedir. Oluşan bu yapılar ise, bakterilerin antibiyotik tedavilerine karşı büyük bir direnç kazanmasına yol açar. Bu durum, tedavi edilemeyen ve kronikleşen enfeksiyonlara neden olabilir [Idrees et al., 2021].

L. monocytogenes genellikle gıda kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkilendirilen bir patojen olmasına karşın sağlık endüstrisinde de önemli tehditler yaratmaktadır. Biyofilm oluşturan *L. monocytogenes*, bağışıklık sistemi zayıf olan hamile, yaşlı ve immün yetmezliği olan kişilerde ciddi enfeksiyonlara sebep olabilir. Bu tip enfeksiyonlar daha karmaşık ve tedavi edilmesi güç hal alır [Ghosh et al., 2021].

Zong ve arkadaşlarının yayınladıkları bir çalışmada, *S. aureus* biyofilmleri üzerine siprofloksasin uygulandığında, biyofilmin yüzeyindeki bakterilerde belirli bir azalma gözlemlenmiş, ancak biyofilm matriksinin derin kısımlarında kalan bakteriler, antibiyotiğe dirençli kalmaya devam etmiştir. Araştırmacılar, biyofilmdeki bakterilerin düşük metabolik aktiviteye sahip olduğu için antibiyotikten etkilenmediğini belirtmişlerdir [Zong et al., 2021].

Rifampin, özellikle *S. aureus* gibi gram pozitif bakterilere karşı etkili olan bir antibiyotiktir. Ancak, rifampin ile yapılan biyofilm tedavisi, biyofilmin tüm katmanlarında etkin olamamaktadır çünkü biyofilmdeki bakteriler rifampine karşı oldukça dirençlidir. Yapılan bir çalışmada, rifampinin *S. aureus* biyofilmleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve antibiyotiğin biyofilmdeki bakterileri tamamen ortadan

kaldıramadığı sonucuna varılmıştır. Rifampin, biyofilmin yüzeyine etki etmekle birlikte, biyofilmin derinliklerine nüfuz edememektedir [Chin et al., 2021].

Vankomisin, özellikle metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan bir glikopeptid antibiyotiktir. Zhao ve arkadaşlarının 2021 yılında yayınladıkları çalışmaya göre, *S. aureus* biyofilmlerine vankomisin uygulandıktan sonra, biyofilmdaki bakterilerde azalma gözlemlenmiş olsa da, biyofilmin içindeki bakteriler hala hayatta kalmıştır. Vankomisin, biyofilm matriksinin içine nüfuz etmekte zorluk yaşamaktadır, bu da biyofilmlerin ortadan kaldırılmasını zorlaştırmaktadır [Zhao et al., 2021].

Amikasin, aminoglikozid antibiyotikleri sınıfına ait bir ilaçtır ve genellikle gram negatif bakterilere karşı etkili olmasına karşın, bazı gram pozitif bakteriler üzerinde de etkilidir. Moradali ve arkadaşları *S. aureus* biyofilmlerinin amikasin tedavisiyle tam olarak temizlenemediği bildirilmiştir. Amikasin tedavisi, biyofilmdaki bazı bakterileri öldürse de, biyofilm yapısının içinde kalan bakteriler direnç geliştirmeye devam etmektedir. Bu durum, amikasin gibi antibiyotiklerin biyofilm üzerinde etkili olabilmesi için daha yüksek konsantrasyonlar ve uzun süreli tedavi gerektirdiğini göstermektedir [Moradali et al., 2022].

Amoksisilin, beta-laktam sınıfından bir antibiyotiktir ve birçok gram pozitif bakteriye karşı etkilidir. Ancak, *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde yapılan bir çalışmada, amoksisilin tedavisinin biyofilmdaki bakterilere etkisinin sınırlı olduğu ve biyofilm yapısının antibiyotiğe karşı dirençli kalmaya devam ettiği gösterilmiştir. Araştırma, biyofilmdaki bakterilerin daha az metabolik olarak aktif oldukları için amoksisilin etkinliğini azaltan bir engel oluşturduğunu belirtmiştir [Jiang et al., 2021].

Eritromisin, makrolid sınıfından bir antibiyotiktir ve genellikle gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerine yapılan bir çalışmada, eritromisinin biyofilm üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu belirtilmiştir. Eritromisin tedavisi, biyofilm yüzeyindeki bakterilere karşı etkili olsa da, biyofilmdaki derin katmanlardaki bakterilerde ciddi bir azalma sağlanamamıştır. Bu durum, biyofilm yapısının antibiyotikleri etkisiz hale getiren bir bariyer oluşturduğunu ortaya koymaktadır [Sarem et al., 2020].

Klindamisin, özellikle gram pozitif bakterilere karşı etkili olan bir antibiyotiktir. Ancak, Li ve arkadaşlarının çalışmasında *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde klindamisin tedavisinin yetersiz olduğu ve biyofilmdeki bakterilerin tamamen yok edilemediği rapor edilmiştir. Biyofilm yapısının, antibiyotiğin etkinliğini sınırladığı ve biyofilm içindeki bakterilerin hayatta kalmaya devam ettiği belirtilmiştir. Bu çalışma, biyofilm tedavisinde antibiyotiklerin tek başına yeterli olamayacağını ve biyofilm çözme ajanlarının da kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır [Li et al., 2020].

Bu çalışmalar, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde antibiyotiklerin etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Biyofilm yapısının, antibiyotiklerin bakterilere ulaşmasını engelleyen bir bariyer oluşturduğu ve biyofilmdeki bakterilerin metabolik olarak daha az aktif olmaları nedeniyle antibiyotik tedavilerine karşı direnç geliştirdikleri ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, biyofilm tedavisi için antibiyotiklerin yanı sıra biyofilm çözme ajanları, kombinasyon tedavileri ve alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir.

Biyofilm oluşturan *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterileri sağlık endüstrisi güvenliği açısından büyük tehditler oluşturur. Bu bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri, antibiyotik tedavilerine karşı direnç geliştirmelerine ve enfeksiyonları kronikleştirmelerine yol açar. Bu durum, özellikle protez, implant ve tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonlarda ve bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. Bu nedenle, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve tedavi edilmesi için yeni stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir [Sharma et al., 2023].

2.8. Bitki Bazlı Biyoaktif Bileşikler ve Önemi

Bitki materyalleri sahip oldukları geniş yapısal çeşitlilik spektrumu sayesinde hastalıkların tedavi edilmesi, gıda ürünlerinin korunması veya ortam temizliğini sağlamak gibi birçok insan sağlığı ile direkt ilişkide olan konu için tercih edilmektedir. Günümüzde “ikincil metabolitler” olarak adlandırılan bitki bazlı biyoaktif bileşiklerin bu alanlarda kullanılmasının tarihi Mezopotamya topraklarına kadar eski bir tarihe dayanmaktadır.

Bitki ikincil metabolitleri aslında bitkinin kendini stres koşullarına ve mikroorganizma saldırılarına karşı çeşitli kısımlarından salgıladığı fitokimyasallar ile kendini koruduğu

bir doğal savunma sistemidir. Bu biyoaktif bileşiklerin rolü yalnızca bitkinin kendisini korumak değildir, aynı zamanda çeşitli terapötik uygulamalara da olanak tanıyarak geniş bir biyokimyasal ağ içinde aktivite gösterirler.

20. yüzyılın sonlarında bitkinin yaprak, kök, gövde ve meyvesi dahil olmak üzere tüm bölgelerindeki ikincil metabolitlerin etkileri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bitki bazlı ikincil metabolitler, antimikrobiyal [Jones et al., 2004; Teshika et al., 2018], kardiyovasküler hastalıkların tedavisi [Edewor et al., 2011], analjezik [Prakash et al., 2005; Teshika et al., 2018], anti-inflammatuvar [Eliasova et al., 2004; Weathers et al., 2012; Damanhour et al., 2014; Abdullah et al., 2016], antineoplastik [Brant et al., 2016], anti-sıtma [Wang et al., 2010; Musayeib et al., 2014], antioksidan [Bairwa et al., 2012; Chauhan et al., 2015; Sharma et al., 2015], anti-kanser [Weathers et al., 2012; Mehboob et al., 2017], antifungal [Wang et al., 2010; Boukhatem et al., 2014], antibiyotik [Eliasova et al., 2004], göz hastalıkları [Bhat et al., 2008], mide hastalıkları [Nassar et al., 2010], anti-diyabetik [Mehboob et al., 2017; Zhao et al., 2018], anoreksiya [Sasidharan et al., 2012], ateş düşürücü [Surveswaran et al., 2007] gibi literatürde kazandırılmış birçok etkiye sahiptir.

Bitki ikincil metabolitleri, karmaşık bir yapıya sahip olmalarına rağmen özellikle tamamen sentetik kaynaklara göre daha biyolojik uyumlu ve ilaca benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, araştırmacılar doğal kökenli moleküllerin daha iyi adaylar olduğunu düşünerek çalışmalarını bu konunun üzerine yoğunlaştırmışlardır.

Bitki ikincil metabolitlerinin özellikle minimum etki konsantrasyonu hakkında hala deneme aşamasında bazı sorunlar vardır. Bu bileşikler, bitki hücrelerinde eser miktarlarda üretilirken, endüstriyel kullanım ve kimyasal türevlerinin üretimi noktasında saflık sorunu teşkil etmektedir.

Genetik ve ışık, su, sıcaklık, pH gibi çevresel faktörler bitki ikincil metabolitlerinin biyosentezini, konsantrasyonunu ve birikimini etkilese de bu bileşiklerin biyoyararlanımı ve biyoaktivitesi potansiyel terapötik uygulamalar için büyük önem arz etmektedir.

2.9. Bitki Bazlı Biyoaktif Bileşikler ile Bakteriyel Biyofilmlerin Biyokontrolünün Sağlanması

Çeşitli bitki bazlı biyoaktif bileşiklerin DNA ve protein sentezini engelleyebildiği, oksidatif solunumu durdurabildiği, hücre zarı bütünlüğünü bozabildiği, antibiyotik etki gösterdikleri ve bakteriyel suşların biyofilm oluşumunu engellediği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [Khouchlaa et al., 2017; Bouyahya et al., 2021; Salehi et al., 2021]

Bitki bazlı biyoaktif bileşikler, genel olarak iki ana mekanizma kullanarak antibiyofilm ajanları olarak görev alırlar. Bu mekanizmalardan ilki, ilk tutunma ve EPS üretimi ile mücadele ederek biyofilm oluşumunu engellemeyi amaçlar. İkinci mekanizma ise biyofilm oluşumunun olgunlaşmadan ayrılmaya kadar olan sürecini hedefler. Bu mekanizmada antibiyofilm ajanları, olgun biyofilm yapısını bozmayı veya parçalamayı hedefleyerek biyofilm oluşumunu engellemeye çalışır [Chen et al., 2013].

Yapılan çalışmalar, oluşan biyofilmlerin ortamdan yok edilmesinin çoklu antibiyotiğe dirençli bakteri fenotiplerini ortaya çıkardığını ve konakçı hücrelere zarar veren kronik enfeksiyonların oluştuğunu göstermektedir [Chen et al., 2013; Solano et al., 2014]. Dolayısıyla, biyofilm oluşumunun önlenmesi üzerine yapılan çalışmalar çok daha avantajlı olacaktır.

Çeşitli yüzey kaplamaları sayesinde bakterilerin yüzeye yapışması engellenebilmektedir. Bu kaplamalar, yüzeyin hidrofobikliği gibi özelliklerini değiştirerek veya antimikrobiyal molekülleri yüzeye emprenye ederek yapılır. Trentin ve ekibi 2015 senesinde yayınladıkları çalışmalarında, *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R. W. Jobson'ın yapraklarından izole edilen proantosiyanidin adlı bir bileşiğin, yüzeyin özelliklerini değiştirerek *S. epidermidis*'in yüzeye yapışmasını engellediğini ve bu sayede biyofilm oluşumunun azaldığını belirtmişlerdir [Trentin et al., 2015].

Bakterilerin virülans potansiyelini hedeflemek de bir başka biyofilm oluşumunu inhibe etme stratejisidir. Bu strateji, dirençli fenotiplerin ortaya çıkmasını ve yayılmasını kontrol etme avantajı sağlayarak en etkili yaklaşımlardan biri olarak kabul edilir. Biyofilm oluşumunda ve olgunlaşmasında görev alan bir dizi virülans faktörü quorum-sensing tarafından kontrol edilir ve bitki biyobazlı bileşikler quorum-sensingi hedef

olarak virölans faktörlerinin baskılanmasını sağlar; böylelikle biyofilm oluşumu inhibe edilir [Paluch et al., 2020; Zhou et al., 2020]. Örneğin, *Melaleuca bracteata* bitkisinden elde edilen metil eugenol zengini esansal yağ, *Chromobacterium violaceum*'un quorum-sensing mekanizmasında yer alan bir sinyal molekülü olan C6-HSL üretimini baskılayarak biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir [Wang et al., 2016]. Rosmarinik asit ise *Aeromonas hydrophila*'da hemolizin, lipaz ve elastaz üretimini baskılayarak biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir [Rama Devi et al., 2016]. Polifenoller açısından zengin bir kızılçık özünün, *Vibrio cholerae*'daki biyofilm matris üretimini azaltabildiği ve bu durumun biyofilm oluşumunu başlangıç aşamasında engelleyebildiği gözlemlenmiştir [Pederson et al., 2018].

Bu bağlamda, bitki bazlı biyoaktif bileşiklerin özellikle yüzeylere bakteri yapışmasının inhibisyonuna, matris üretiminin azaltılmasına, virölans faktörlerinin ekspresyonunun baskılanmasına ve quorum-sensing mekanizmasının engellenmesine dayanan geniş bir antibiyofilm aktivitesine sahip olduğunu gösteren çalışmalar ilgi çekmeye devam etmektedir [Gong et al., 2021; Manzoor et al., 2023; Nwafor et al., 2024]. Ancak, bakterilerin her geçen gün antibiyofilm ajanlara direnç kazandığı göz önüne alındığında bu alanda daha fazla ve etkili bitki bazlı antibiyofilm ajanların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.10. *Rosa canina* L. Bitkisinin Genel Özellikleri

Rosa canina L. (RC), Rosaceae familyasına ait, küçük meyvesi olan ve yüksek C vitaminine sahip olan tıbbi bir bitkidir. Halk arasında kuşburnu bitkisi olarak anılır. Ayrıca flavonoidler ve fenolik gibi bileşikler içeren RC bitkisi, yüksek düzeyde antioksidan, antimutajenik ve antikanserojenik etkilere sahiptir [Montazeri et al., 2011]. Hidroksil (OH⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) radikallerini azaltma, ağır metal iyonlarını şelatlama ve serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırma özellikleri ile doğal bir antioksidan olmakla birlikte sentetik katkı maddelerinin yerini alabilme konusunda araştırmalar devam etmektedir [Egea et al., 2010]. Böbrek, iltihaplanma, gut, dispepsi gibi çeşitli hastalıklara karşı önleyici ve iyileştirici aktivitesinin bulunduğu raporlanmıştır [Wenzig et al., 2008].

Literatürde RC bitkisi ekstraktı ve yağları ile yapılmış birçok antimikrobiyal ve antibiyofilm etki çalışmaları mevcuttur. Yapılan literatür araştırmasında, RC bitkisinin

hazır suşları üzerindeki antimiktobiyal ve antibiyofilm etkinin araştırıldığı tespit edilmiştir.

Öz ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışma sonuçlarına göre, RC bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen uçucu yağların *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı orta düzeyde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [Öz et al., 2021].

Rovná ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışma sonuçlarına göre, RC bitkisi meyvelerinin etanolik ekstraktlarının *E. coli* ve *Klebsiella oxytoca* üzerinde duyarlı olduğu tespit edilmiştir [Rovná et al., 2020].

Masnavi ve Hassanzadeh, çalışmalarında RC bitkisinin hidroalkolik ekstraktını kullanarak *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen veriler, RC bitkisinin hidroalkolik ekstraktının *S. aureus* üzerinde incelenen diğer 3 bakteriden daha iyi antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir [Masnavi ve Hassanzadeh, 2024].

Živković ve arkadaşlarının çalışmasına göre, RC bitkisi yapraklarının metanolik ekstraktının *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* üzerinde antibiyofilm etkisi olduğunu göstermektedir [Živković et al., 2015].

Bu tez çalışmasında, literatürden farklı olarak tüketime sunulan peynirlerden izole edilen *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin RC bitkisi ekstraktı ile inhibisyonuna çalışılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan suşların tüketime hazır peynir örneklerinden elde edilen izolatlar olması ve doğal suşların oluşturdukları biyofilmin RC bitkisi ekstraktı ile biyokontrolü etkinliğinin incelenecek olması literatüre yeni ve ilgi çekici katkılar sağlayacaktır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan Mueller-Hinton Broth (MHB), Tryptic Soy Broth (TSB), agar ve pepton Biolife (Milano, İtalya); Luria Bertani Broth (LB) HiMedia (Mumbai, India); Half Fraser broth, Listeria Xpress (LX) broth, Fraser broth, API Listeria kiti, Columbia agar, ALOA agar, PALCAM agar, VIDAS LMO2 kiti, VIDAS LDUO kiti Biomeriux (ABD); etanol Alkomed (Plovdiv, Bulgaristan), gentamisin, kristal viyole Merck (Darmstadt, Almanya); petri kapları FıratMed (Türkiye); 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası TPP (Darmstadt, Almanya); HCCA (α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit) Bruker (Almanya); peynir örnekleri yerel pazar ve marketlerden Ocak 2023 tarihinde (Ümraniye, İstanbul) ve kurutulmuş kuşburnu meyveleri İstanbul'da yerel bir satıcıdan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan peynirlerin tartım ve sulandırma işlemi dilumat (Biomeriux, ABD) ve homojenizasyon işlemi BagMixer 400 W stomacher (Interscience, Fransa) ile gerçekleştirildi. Hazırlanan numunelerin ve izolatların uygun sıcaklıkta inkübe edilmesi için bir çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Innova 24, Almanya) ile inkübatör (Mettler GmbH UN 55, Almanya) kullanıldı. *L. monocytogenes* identifikasyonu, VIDAS ve heat-and-go (Biomeriux, ABD) cihazları kullanılarak gerçekleştirildi. *S. aureus* identifikasyonu için MALDI-TOF-MS cihazı (Bruker, Almanya) kullanıldı. Gelişen bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunu belirlemede bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1900i, Almanya) kullanıldı. İzole edilen mikroorganizmalar +4 °C'de buzdolabında saklandı (ThermoFisher Scientific TSX, ABD). Biyofilm oluşumunun biyokontrolünün absorban değerlerini uygun dalga boyunda ölçmek için bir ELISA okuyucu (ThermoScientific Multiskan FC, Almanya) kullanıldı. Tüm deney malzemelerinin ve hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu bir otoklav cihazı (Tuttnauer T-Max, ABD) kullanılarak yapıldı.

Kurutulmuş kuşburnu meyvesini toz haline getirmek için bir mutfak blenderı (Sinbo, SCM-2934, Düzce, Türkiye) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi mikrodalga (Arçelik MD-524S, İstanbul, Türkiye) ve su banyosunda (Isolab, Ultrasonic Cleaner 621.05.001, Bavaria, Almanya) gerçekleştirilirken; çökelti ile üst sıvının ayrılması ise santrifüj cihazında (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) yapıldı. Ekstraktlardaki çözücü ve fazla suyun uzaklaştırılması döner buharlaştırıcı (Heidolph Hei-VAP, Bavaria, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu tez çalışmasında Microbiologics marka *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşu kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Peynir Örneklerinin Toplanması

Pastörize inek sütünden yapılan 25 adet tüketime sunulan tam yağlı beyaz peynir, 14 adet tam yağlı lor peynir, 1 adet tam yağlı yöresel peynir, 1 adet tam yağlı çeçil peynir ve 1 adet tam yağlı tulum peynir olmak üzere toplam 42 çeşit peynir toplandı (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1.: Yerel halk ve pazarlardan toplanan peynirlerin yapıldığı süt çeşidi, peynir yağ çeşidi, peynirlerin türleri ve adetleri.

Süt çeşidi	Yağ çeşidi	Peynir türleri	Adet
Pastörize, İnek sütü	Tam Yağlı	Beyaz peynir	25
Pastörize, İnek sütü	Tam Yağlı	Lor peynir	14
Pastörize, İnek sütü	Tam Yağlı	Yöresel peynir	1
Pastörize, İnek sütü	Tam Yağlı	Çeçil peynir	1
Pastörize, İnek sütü	Tam Yağlı	Tulum peynir	1

3.2.2. Listeria türlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.2.1 Klasik Yöntem ile *Listeria spp.* ve *monocytogenes*'in İzolasyonu

Her bir peynirden 25 g filtreli stomacher poşetinde tartıldı ve dilusyon oranı 1/9 olacak şekilde 225 g Half Fraser broth besiyeri ile sulandırıldı. Her poşet, numunelerin homojenizasyonu için stomacherda 1 dakika boyunca karıştırıldı. Stomacher sonrası her poşet atış ile ayrı ayrı kapatıldı ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkubasyon sonrasında, poşetin filtre ile süzölmüş kısmından 1 mL süspansiyon 1 mL'lik serolojik pipet yardımı ile 9 mL'lik bir fraser broth tüpüne (Biomeriux) aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bir öze dolusu süspansiyon PALCAM agar (Biomeriux) ile *Listeria* türleri için kromojenik agar olan ALOA agar (Biomeriux)'a çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. ALOA agarda görülen zonlu, mavi koloniler ve PALCAM agarda görülen zeytin yeşili siyah koloniler şüpheli koloni olarak kabul edildi ve ileri tanımlamaya devam etmek için TSA (Tryptic Soy) agar (Oxoid) üzerine çizilerek 30°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası TSA agardan koloni alındı ve biyokimyasal testler yardımıyla şüpheli kolonilerin konfirmasyonu için API *Listeria* testleri (Biomeriux) yapıldı [Public Health England, 2014; Türk Standartları Enstitüsü, 2017].

3.2.2.2 VIDAS Yöntemi ile *Listeria spp.* ve *monocytogenes*'in İzolasyonu

Her peynirden 25 g alınarak ayrı ayrı filtreli stomacher poşetinde tartıldı ve dilusyon oranı 1/9 olacak şekilde 225 g Half Fraser broth ve *Listeria* Xpress (LX) broth (Biomerieux) ile sulandırıldı. Her poşet, numunelerin homojenizasyonu için stomacherda 1 dakika boyunca karıştırıldı. Stomacher sonrası her poşet atış ile ayrı ayrı kapatıldı ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi [Türk Standartları Enstitüsü, 2017].

3.2.2.2.1 VIDAS LDUO Yöntemi ile *Listeria spp.* ve *monocytogenes*'in İzolasyonu

İnkübasyon sonrasında, LX broth ile sulandırılmış olan poşetin filtre ile süzölmüş kısmından 100 µL süspansiyon alınarak 5 mL LX broth içeren tüpe aktarıldı. Tüpler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında her tüpten 500 µL alındı

ve LDUO VIDAS stripine aktarıldı. Stripler, 15 dakika boyunca heat&go cihazında 131 ± 3 °C'de ısıtıldı, ısıtma işlemi bittikten sonra striplerin oda sıcaklığına gelmeleri beklendi ve uygun sıcaklıktaki stripler VIDAS cihazına yüklendi. LDUO iğneleri cihaza yerleştirildi ve bilgisayardan LDUO programı seçilerek analiz başlatıldı.

VIDAS cihazında okunan Tv (test value) ≥ 0.1 olması durumunda numune *Listeria spp.* şüphelisi olarak değerlendirildi ve confirmasyon için LX broth tüpündeki süspansiyonlar ALOA agar ve PALCAM agara çizgi ekim yöntemiyle ekilerek 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. ALOA agarda görülen zonlu, mavi koloniler ve PALCAM agarda görülen zeytin yeşili siyah koloniler şüpheli koloniler seçildi ve TSA (Tryptic Soy) agar (Oxoid) üzerine ekildi, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Biyokimyasal testler yardımıyla şüpheli kolonileri belirlemek için API *Listeria* testleri (Biomeriux) yapıldı [Türk Standartları Enstitüsü, 2017; Geiss ve ark., 1985; Ieven ve ark.; 1995; Jenkins ve ark.; 1991].

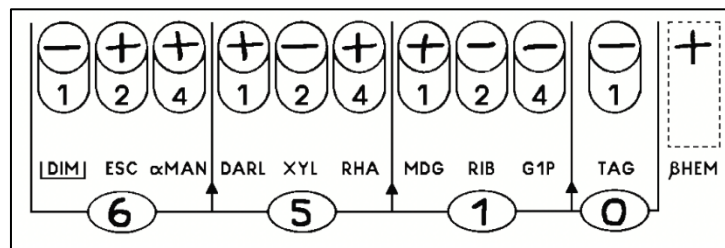
3.2.2.2.2 VIDAS LMO2 Yöntemi ile *Listeria spp.* ve *monocytogenes*'in İzolasyonu

İnkübasyon sonrasında, Half Fraser broth ile sulandırılmış olan poşetin filtre ile süzölmüş kısmından 1 mL süspansiyon alınarak 9 mL fraser broth içeren tüpe aktarıldı. Tüpler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her tüpten 500 ul alındı ve LMO2 VIDAS stripine aktarıldı, stripler ve iğneler VIDAS cihazına yüklendi, LMO2 programı seçilerek analiz başlatıldı. VIDAS cihazında okunan Tv ≥ 0.1 olması durumunda numune *L. monocytogenes* şüphelisi olarak değerlendirildi ve confirmasyon için fraser broth tüpündeki süspansiyonlar ALOA agar ve PALCAM agara çizgi ekim yöntemiyle ekilerek 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. ALOA agarda görülen zonlu, mavi koloniler ve PALCAM agarda görülen zeytin yeşili siyah koloniler şüpheli koloniler seçildi ve TSA (Tryptic Soy) agar (Oxoid) üzerine ekildi, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Biyokimyasal testler yardımıyla şüpheli kolonileri belirlemek için API *Listeria* testleri (Biomeriux) yapıldı [Türk Standartları Enstitüsü, 2017].

3.2.2.3 API *Listeria* ile Şüpheli *L. monocytogenes* Suşlarının Konfirmasyonu

3.2.2.3.1. API *Listeria* metodu

Klasik ve VIDAS yöntemlerinden elde edilip TSA agara çizilmiş şüpheli petrilerinden özellikle genç koloniler seçildi ve öze yardımı ile API *Listeria* (Biomeriux) kitinden çıkan 2 mL'lik API® Suspension Medium (MED) ampülüne aktarıldı. Suspansiyon vortekslenerek homojenizasyon sağlandı. Suspansiyon bulanıklığı McFarland'ta 1'e eşitlendi. Bulanıklık kontrolü için API *Listeria* kitinden çıkan ve McFarland standardı 1 olduğu bilinen MED ile karşılaştırma yapıldı. API kuyucuklarının kurummasının önüne geçmek için API kutusuna 3 mL steril su konuldu. Pastör pipet yardımı ile bakteriyel suspansiyon kuyucuklarda belirtilen çizgiye kadar ve kabarcık oluşumundan kaçınılarak dağıtıldı. Yalnızca enzimatik substratın yer aldığı [DIM] kuyucuğunda kubbe oluşturuldu. Aktarım tamamlandıktan sonra kutu kapağı kapatıldı ve 37°C 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası [DIM] kuyucuğuna kit içerisinde çıkan ZYM B reaktifinden 1 damla damlatıldı. API okuma tablosuna bakılarak kuyucuklarda gözlemlenen renkler pozitif ve negatif olarak okuma kağıdına not edildi (Şekil 3.1.). Tabloda her bir test için çıkan sayı değerleri toplandı ve sonuçlar APIWEB™ yazılımına girilerek bakterinin identifikasyon sonucu ve yüzdeleri elde edildi [Türk Standartları Enstitüsü, 2017].



Şekil 3.1: *L. monocytogenes* için API sayısal profil örneği.

3.2.2.3.2. Gram boyama

TSA agara çizilmiş şüpheli petrilerinden bir koloni alınarak cam lamele konuldu. Pastör pipet yardımı ile bir damla saf su lamele damlatıldı ve öze ile seçilen koloni lamelin üzerine yayıldı. Hazırlanan preparat 3 saniye kadar ateş ile fiks edildi ve sonrasında lamel oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamel sırasıyla 1

dakika kristal viyole, 1 dakika iyot çözeltisi, 30 saniye %96'lık etanol ve 1 dakika safranin ile muamele edildi ve her bir adıma geçişte preparat saf su ile nazikçe temizlendi. İşlem sonrasında preparatın kurumaya bırakıldı ve kuruduktan sonra sırasıyla 4X, 10X ve 40X ve immersiyon yağı damlatılarak 100X altında mikroskop incelemesi yapıldı. Gram reaksiyonu pozitif olan, çubuk şekilli bakteriler *Listeria spp./L. monocytogenes* olarak değerlendirildi [Gram, 1884].

3.2.2.3.3. Hemoliz Testi

TSA agardan seçilen koloniler API testi yapılırken ayrıca %5 koyun kanı içeren Columbia (Biomérieux) agara çizgi ekimi ile ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında oluşan berrak, şeffaf zon o koloninin β -hemolitik aktivite gösterdiği dolayısıyla *L. monocytogenes* olabileceğini gösterdi. [Gerhardt ve ark., 1994].

3.2.3. S. aureus'un İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.3.1. Baird Parker Agar ile S. aureus İzolasyonu

10 g peynir numunesi, 90 g PBS (fosfat tamponu) ile filtreli stomacher poşetinde seyretilti ve poşet, stomacher ile 1 dakika boyunca homojenleştirildi. Stomacher poşetinin filtre ile süzölmüş kısmından pipet yardımı ile 1 mL süspansiyon alınarak 9 mL'lik PBS tüpüne aktarıldı ve 10^{-3} 'e kadar seri dilusyon yapıldı. Her dilusyon katsayısından toplam 3 petri Baird-Parker agara (BPA) (Oxoid) 0.3, 0.3 ve 0.4 mL olacak şekilde 1 mL süspansiyon bölünerek yayma plak yöntemi çalışıldı. İnkübasyon 37°C'de 48 saatte tamamlandıktan sonra etrafı zonlu, siyah koloniler *S. aureus* olarak kabul edildi ve toplam sayı alındı. Doğrulama testi olarak eğer ki bir petride 5 ve 5'ten fazla koloni varsa 5 adet, 5'ten az koloni varsa petrideki tüm koloniler alınarak Rabbit Plasma Fibrinogen agara (RPF) batırılıp düz bir çizgi şeklinde çizildi. 37°C'de 48 saat süren inkübasyon sonrasında etrafında zon gözlemlenen kolonilerin *S. aureus* olduğu doğrulanmış kabul edildi [Türk Standartları Enstitüsü, 6582-1, 2021].

3.2.3.2. Gram Boyama

TSA agar'da saflaştırılmış olan *S. aureus* petrilerinden bir koloni alınarak cam lamele konuldu. Pastör pipet yardımı ile bir damla saf su lamele damlatıldı ve öze ile seçilen koloni lamelin üzerine yayıldı. Hazırlanan preparat 3 saniye kadar ateş ile fikse edildi ve sonrasında lamel oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamel sırasıyla 1 dakika kristal viyole, 1 dakika iyot çözeltisi, 30 saniye %96'lık etanol ve 1 dakika safranin ile muamele edildi ve her bir adıma geçişte preparat saf su ile nazikçe temizlendi. İşlem sonrasında preparatın kurumaya bırakıldı ve kuruduktan sonra sırasıyla 4X, 10X ve 40X ve immersiyon yağı damlatılarak 100X altında mikroskop incelemesi yapıldı. Gram reaksiyonu pozitif olan, kok bakteriler *S. aureus* olarak değerlendirildi [Gram, 1884].

3.2.3.3. MALDI-TOF-MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)

Tanımlaması yapılacak olan *S. aureus* suşları TSA agar'a çizgi ekim yöntemi ile taze kültür elde etmek amacı ile pasaj alınarak 18-24 saat boyunca 30-35 °C etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, tek düşen kolonilerden steril transfer kürdan yardımı ile alınarak "target" adı verilen metal plakada seçilen noktaya ince bir tabaka olacak şekilde dairesel hareketler ile yayıldı. Üzerine 1 µl HCCA (α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit) çözeltisi damlatıldı ve hava ile kuruma işlemi tamamlanarak örnek cihaza verilmeye hazır hale getirildi. Target cihaza yerleştirildi ve okuma işlemi gerçekleştirildi [Bruker, 2023; Rahi ve ark., 2016].

3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

10 gram peynir filtreli stomacher poşetinde tartıldı ve üzerine 90 gram PBS eklendi. Peynir ve PBS içeren poşet stomacher yardımı ile homojenleştirildi. 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar yapılan seri dilusyon solusyonlarından 1 mL alınarak petri kaplarına aktarıldı ve üzerine M17 agar (Merck) dökülüp dökme plak yöntemigerçekleştirildi. Petriler 30°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mekik görünümündeki kolonilerin laktik asit bakterisi olabileceği kabul edildi ve toplam sayıları alındı [Ravula ve Shah, 1998].

3.2.5. *Rosa canina* L. Ekstraktlarının Hazırlanması

Kuşburnu (*Rosa canina* L.) meyvelerinin ekstraktları, mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi uygulanarak elde edildi. Kuşburnu meyveleri yerel bir dükkandan satın alındı ve tohum ve meyve tozlarından arındırıldı. Daha sonra meyveler bir öğütücü ile toz haline getirildi. Ekstraksiyon için 10 g kuşburnu tozu ve %50 etanol 1:10 [w/v] oranında karıştırıldı ve, 120W gücünde 3 dakika süre ile mikrodalga fırında [Arçelik, MD574S Microwave] ısıtıldı. Ekstraktlar 4000 rpm x 15 dk x +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar toplandı ve 100 rpm, 55°C ve 60 dk'da buharlaştırıldı [Rovna et al., 2015]. Ekstraktlar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.6. Ekstraktın Kuru Madde Tayini

1 mL ekstrakt çözeltisi, darası alınmış bir mikrofüj tüpüne eklendi. Tüp, 70°C'de 2 gün boyunca kurutulduktan sonra, kuru ağırlık tartıldı. 1 mL ekstraktın mg cinsinden ağırlığı hesaplanarak, ekstraktların kuru madde miktarı mg/mL cinsinden belirlendi. Bu işlem her ekstrakt için 3 kez tekrarlandı [Herodez et al., 2003].

3.2.7. İzolatların Biyofilm Oluşum Kapasitesinin İncelenmesi

İzolatların biyofilm oluşum kapasiteleri mikrotitrasyon plaka testi yöntemiyle karşılaştırıldı. Bu amaçla, izolatlar %2 (w/v) glukoz içeren TSB besiyerinde, 50 mL hacimli erleninde toplam 10 mL hacimde ekildi ve 37 °C'de, 180 rpm'de çalkalama hızında, 16-18 saat boyunca inkübatörde ön kültür inkübasyonuna bırakıldı.

Mikrotitrasyon plakası kuyucuklarındaki son bakteri yoğunluğu, OD 600 nm değeri 0.02 olacak şekilde (yaklaşık 10^6 kob mL⁻¹) %2 glukoz içeren TSB besiyerinde ayarlandı. Hazırlanan kültürlerden 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasının kuyucuklarına 200 µL eklendi. Bakteri inokülasyonu yapılmayan ve besiyeri içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. Mikrotitrasyon plakaları 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında kültürler nazıkçe döküldü ve kuyular 3 kez distile su ile yıkandı. Mikrotitrasyon plakası, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca kurutuldu. Kuyucuklara %0.5 kristal viyole çözeltisinden 150 µL eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kristal viyole çözeltisi boşaltıldı ve kuyucuklar üç kez distile su

ile yıkandı. Kuyucuklara %95 etanol çözeltisinden 150 µL eklendi ve 15 dakika boyunca inkübe edildi. Kuyucuklardaki çözelti yeni bir plakaya aktarıldı ve 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda absorbans ölçümleri yapıldı [Christensen et al., 1985].

OD 570 nm > 0.1 olduğu durumlarda biyofilm oluşumu pozitif, OD 570 nm < 0.1 olduğu durumlarda ise negatif olarak kabul edildi ve izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri aşağıdaki kategorilere göre yapıldı. OD_c, negatif kontrolün 3 kez ölçülen OD 570 nm ortalaması olarak tanımlanmıştır [Stepanovic ve diğerleri, 2000]. OD ≤ OD_c : biyofilm oluşumu yok.

OD_c < OD ≤ 2 OD_c : zayıf biyofilm oluşumu

2 OD_c < OD ≤ 4 OD_c : orta düzeyde biyofilm oluşumu

4 OD_c < OD : güçlü biyofilm oluşumu

(OD_c : Cut-off optik yoğunluğu, OD : ilgili izolatların optik yoğunluğu)

3.2.8. Ekstraktın Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi

Antimikrobiyal etkinliği değerlendirmek amacıyla izolatlar içerisinde 10 mL TSB besiyeri bulunan 50 mL erlenin içerisine ekilerek 30-35 °C’de ve 180 rpm hızında çalkalanan inkübatörde 16-18 saat ön kültüre alındı. İnkübasyon sonrası, bakteriler 600 nm dalga boyunda 0.1 absorbans değerine (yaklaşık 8×10^7 kob mL⁻¹) ulaşacak şekilde fizyolojik tuzlu su (% 0.9 NaCl) ile seyreltilerek hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonları hızlı karıştırıcı ile karıştırılarak fizyolojik tuzlu su içinde homojen hale getirildi, ardından 100 µL’lik örnekler steril koşullarda LB-A katı besiyeri (12 g/L agar) üzerine yaydırıldı ve kuruması için 10 dakika bekletildi. Agar üzerinde 6 mm çapında steril pastör pipetinin geniş ucu ile kuyular açıldı ve bu kuyulara 40 µL olacak şekilde 6 farklı konsantrasyondaki ekstraktlar (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) eklendi [Oğuzkan vd., 2016].

Karşılaştırma için 10 µg mL⁻¹ konsantrasyonda gentamisin antibiyotiği kullanıldı [Selvados et al., 2018]. 18 saat inkübasyonun ardından, oluşan inhibisyon zonlarının çapları (6 mm kuyu çapı dahil edilerek) ölçüldü ve ekstraktların antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiği ile karşılaştırıldı.

3.2.9. Ekstraktın Minimal İnhibisyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Ekstraktın bakteri hücrelerinin büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyonunu belirlemek için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) deneyi gerçekleştirildi. İzolatlar içerisinde 10 mL MHB besiyeri bulunan 50 mL erlenin içerisine ekilerek 37 °C’de ve 180 rpm hızında çalkalanan inkübatörde 16-18 saat ön kültüre alındı. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarının kuyularındaki bakterilerin optik yoğunluğu 0.1 OD 600 nm absorbans değerine (yaklaşık 8×10^7 kob mL⁻¹) eşit olacak şekilde Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) içerisinde ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları hızlı karıştırıcı ile homojen hale getirildikten sonra, 100 µL alınarak kuyulara eklendi. Aynı hacimde, farklı konsantrasyonlarda (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ekstrakt dilüsyonları da eklendi [Vaillancourt et al., 2018].

Ekstraktın 1:1 dilüsyonunun bakteri büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu 0.1 absorbans değerinde olacak şekilde 1 mL bakteri süspansiyonu mikrofüj tüplerine alındı ve 10,000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve pellete 1 mL ekstrakt çözeltisi eklendi, karışım hızlı karıştırıcı ile homojen hale getirildi. Bu çözeltiden 200 µL’lik miktarlar 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarının kuyularına eklendi. Pozitif kontrol olarak ekstrakt eklenmeyen kuyular kullanıldı.

Mikrotitrasyon plakaları 24 saat statik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, FTS (fizyolojik tuzlu su, %0.9) içinde seyreltme yapılarak, 100 µL’lik örnekler LB-A (15 g/L agar) katı besiyerine ekildi. 24 saatlik statik inkübasyonun sonunda, canlı koloni sayımları yapıldı. Ekstrakt dilüsyonlarının bakteriler üzerindeki etkisi, elde edilen sonuçların pozitif kontrolle karşılaştırılması yoluyla inhibisyon oranı (%) hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.10. Ekstraktın Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi

RC bitkisi ekstraktının, bakterilerin biyofilm oluşumunu inhibe edici etkisi değerlendirildi. Bunun için bakteriler, 50 mL hacminde ve 10 mL miktarında %2 glukoz içeren TSB besiyerine eklenerek 37°C’de, 180 rpm hızında çalkalanan inkübatörde 16-18 saat boyunca ön kültüre alındı.

Mikrotitrasyon plakalarındaki kuyuların final bakteri yoğunluğu OD 600 nm değeri 0.1 olacak şekilde (yaklaşık 10^6 kob mL^{-1}) % 2 glukoz içeren TSB besiyerinde ayarlandı. Her kuyuya 100 μL kültür eklendi. Aynı hacimde, farklı konsantrasyonlarda (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ekstrakt dilüsyonları da ilgili kuyulara eklendi ve mikrolaka inkübatöre konuldu [Sánchez et al., 2016].

Mikrotitrasyon plakaları 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler nazıkçe döküldü ve kuyular 3 kez distile su ile yıkandı. Plakalar 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Kuyulara 200 μL % 0.5 kristal viyole çözeltisi eklendi ve 15 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Kristal viyole çözeltisi döküldü ve kuyular tekrar 3 kez distile su ile yıkandı. Ardından, kuyulara 200 μL % 95 etanol çözeltisi eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. Etanol çözeltisi yeni bir plakaya transfer edildi ve 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbans ölçümleri yapıldı [Akbas ve Çağ, 2016]. Elde edilen sonuçlar, minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyon (MBİK) (%) olarak hesaplandı [Kang et al., 2018].

Minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonları (MBİK) (%) aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu (MBİK) (\%)} = \left(100 - \frac{B-A}{C-A}\right) \times 100$$

A: Bakteri içermeyen, ekstrakt ile muamele edilmiş kuyuların OD değeri.

B: Ekstrakt ile muamele edilmiş kuyuların OD değeri,

C: Ekstrakt ile muamele edilmemiş kuyuların OD değeri

3.2.11. İstatiksel Analizler

Bu tez çalışmasında, tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı. İstatistiksel analizler Microsoft Office ve Excel 2024 programı kullanılarak yapıldı. p değerleri, tek kuyruklu t-testi ile RC bitkisi ekstraktının kuru madde miktarı ve antimikrobiyal etkinlikleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı belirlendi. Antimikrobiyal etkinlikler, gentamisin antibiyotiği ile karşılaştırıldı; RC bitkisi ekstraktının minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonu değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Kırk iki farklı peynir örneğinden izole edilen ve identifikasyonu sağlanan bakteriler, aşağıdaki sıralamaya göre isimlendirildi;

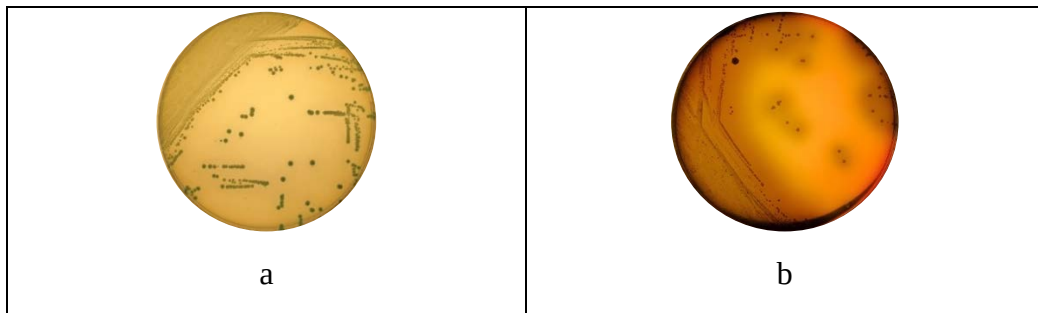
- *S. aureus* için SA, *L. monocytogenes* için LM kısaltmaları kullanıldı.
- İzolatın tespit edildiği peynir cinsi: Çeçil peynir için C, beyaz peynir için P, lor peynir için L, yöresel peynir için Y ve tulum peynir için T harfi kullanıldı.
- İzolatın tespit edildiği peynirin sıralaması için izolata numara verildi. Örneğin, 2 numaralı beyaz peynirden izole edilen *S. aureus* izolatu için SAP2 kodu verildi.

4.1.1. *Listeria monocytogenes* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Klasik yöntem, VIDAS LMO2 ve VIDAS LDUO olmak üzere 3 farklı metod yardımı ile 42 farklı peynir türünden toplamda 5 farklı *L. monocytogenes* izole edildi.

- Klasik yöntem

ALOA agarda gözlemlenen zonlu, mavi koloniler ile PALCAM agarda gözlemlenen zeytin görünümlü siyah koloniler *Listeria spp.* suşu şüphelisi olarak kabul edildi ve biyokimyasal testler yardımı ile ileri tanımlama yapılmak üzere TSA'ya alınarak +4 °C'de muhafaza edildi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1.: a: ALOA agar üzerinde ve b: PALCAM agar üzerinde *L. monocytogenes* kolonilerinin görüntüsü.

- VIDAS LDUO yöntemi

LX brohtan inkübasyon sonrasında numuneler hazırlanarak VIDAS cihazına verildi ve okunan kültürlerin $Tv \geq 0.1$ olması durumunda kültürler *Listeria spp.* şüphelisi olarak değerlendirildi. Konfirmasyon için LX broth tüpündeki süspansiyonlar ALOA agar ve PALCAM agara çizgi ekim yöntemiyle ekildi. Peynilerden elde edilen 7 örnekte tv değerleri 0.1'in üzerinde bulundu (Tablo 4.1.). Bu koloniler seçildi ve biyokimyasal testler yardımı ile ileri tanımlama yapılmak üzere TSA'ya alınarak +4 °C'de muhafaza edildi.

- VIDAS LMO2 yöntemi

Fraser brohtan inkübasyon sonrasında numuneler hazırlanarak VIDAS cihazına verildive okunan kültürlerin $Tv \geq 0.1$ olması durumunda kültürler *Listeria spp.* şüphelisi olarak değerlendirildi. Konfirmasyon için Fraser broth tüpündeki süspansiyonlar ALOA agar ve PALCAM agara çizgi ekim yöntemiyle ekildi. Peynilerden elde edilen 8 örnekte tv değerleri 0.1'in üzerinde bulundu (Tablo 4.1.). Bu koloniler seçildi ve biyokimyasal testler yardımı ile ileri tanımlama yapılmak üzere TSA'ya alınarak +4 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 4.1.: *L. monocytogenes* şüphelisi tespit edilen kolonilerin izolat kodları, Tv değerleri ve izole edildiği peynirlerin özellikleri.

Peynir Türü	Peynir sıralaması	İzolat Kodu	Tv değeri	Listeria türü
Lor peynir	1	-	1.32	<i>L. welshimeri</i>
Lor peynir	2	-	1.09	<i>L. welshimeri</i>
Lor peynir	3	-	0.47	<i>L. welshimeri</i>
Beyaz peynir	4	LMP4	1.76	<i>L. monocytogenes</i>
Beyaz peynir	5	LMP5	2.03	<i>L. monocytogenes</i>
Beyaz peynir	6	LMP6	1.96	<i>L. monocytogenes</i>
Yöresel peynir	7	-	0.97	<i>L. innocua</i>
Tulum peynir	8	LMT8	2.73	<i>L. monocytogenes</i>
Çeçil peynir	9	LMC9	4.13	<i>L. monocytogenes</i>

- API Listeria yöntemi ile *L. monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu

Klasik ve VIDAS yöntemlerinden elde edilip TSA agara çizilmiş şüpheli petrilerinden özellikle genç koloniler seçildi ve API *Listeria* (Biomeriux) kiti kullanılarak tanımlama yapıldı. LMP4, LMP5, LMP6, LMT8 ve LMC9 izolat kodlu suşların *L. monocytogenes* oldukları API Listeria testi ile doğrulandı (Şekil 4.2. ve 4.3.).



Şekil 4.2.: LMC9 izolatının API görüntüsü.

API LISTERIA V2.0

+

+

+

+

+

+

+

-

-

-

1 2 4

1 2 4

1 2 4

1

DIM ESC αMAN

DARL XYL RHA

MDG RIB G1P

TAG βHEM

7

7

1

0

REFERENCE

DATE

COMMENT

2/9/23

VERY GOOD IDENTIFICATION TO THE GENUS

Strip	API LISTERIA V2.0		
Profile	7 7 1 0		
Note	CONFIRM BY Camp test THE POSSIBILITY OF <i>List.monocytogenes</i>		

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Listeria welshimeri</i>	65.7	0.65	TAG 97%
<i>Listeria innocua</i>	34.1	0.58	DXYL 2%

Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Listeria seeligeri</i>	0.1	0.0	αMAN 5% RHA 0%

Şekil 4.3.: LMC9 izolatının APIWEB™ yazılımı sonuç raporu.

- Gram boyama

Elde edilen *L. monocytogenes* kolonilerine gram boyama testi de yapıldı ve mikroskopik gözlem ile saf kültür elde edildiği doğrulandı.

- Hemoliz testi

API testini doğrulamak için ilgili LMP4, LMP5, LMP6, LMT8 ve LMC9 izolat kodlu bakterileri %5 koyun kanı içeren Columbia (Biomერიux) agara çizildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında oluşan berrak, şeffaf zon o koloninin β -hemolitik aktivite gösterdiği dolayısıyla *L. monocytogenes* olduğu bu test yardımıyla doğrulandı (Şekil 4.4.).

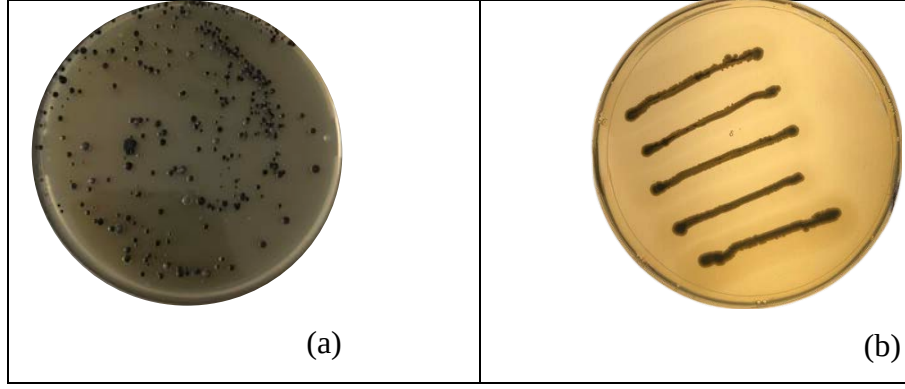


Şekil 4.4: LMC9 izolatının %5 koyun kanı içeren Columbia agar görüntüsü.

4.1.2. *S. aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

- Baird Parker agar ile *S. aureus* izolasyonu

Baird Parker Agar'a ekilen koloniler arasından şeffaf zonlu siyah merkezli tipik koloniler seçildi ve Rabbit Plazma Fibrinojen (RPF) agara geçildi. Etrafında son gözlemlenen koloniler *S. aureus* şüphelisi olarak kabul edildi ve bu koloniler saklanmak üzere Triptik Soy Agar'a pasaj alındı (Şekil 4.5.).



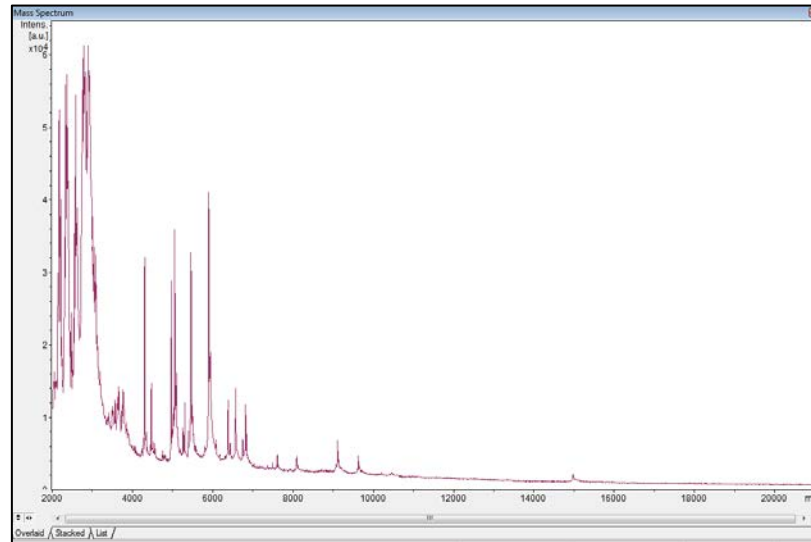
Şekil 4.5.: Baird-Parker Agar üzerinde (a) ve Rabbit Fibrinojen Plazma Agar üzerinde *S. aureus* kolonilerinin görüntüleri (b).

- Gram boyama

Pasaj alınan zonlu koloniler gram boyama işlemine tabi tutularak mikroskopik incelemesi yapıldı. Gram reaksiyonu pozitif olan, kok bakteriler *S. aureus* olarak değerlendirildi.

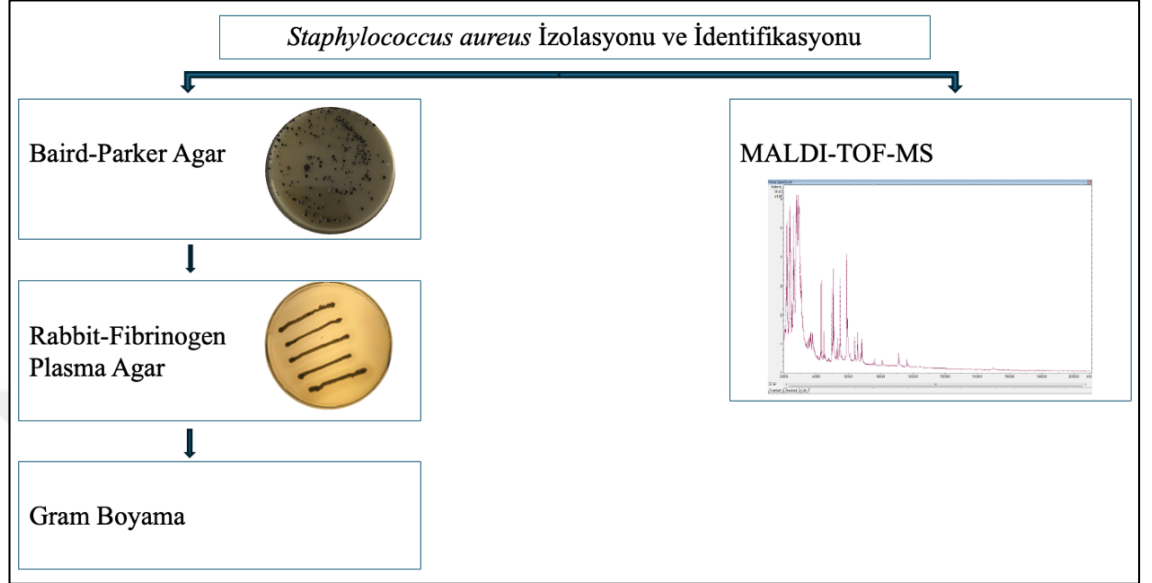
- MALDI-TOF-MS (Matriks ile desteklenmiş lazer dezorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrofotometresi)

Kromojenik agarlarda ve gram reaksiyonu test edilen *S. aureus* suşuna, MALDI-TOF-MS cihazı ile tanımlama yapıldı (Şekil 4. 6.).



Şekil 4.6.: *S. aureus* suşunun MALDI-TOF-MS cihazındaki spektrum görüntüsü.

Elde edilen tüm veriler doğrultusunda, Tablo 4.2.'de verilen ve identifikasyonu gerçekleştirilen 9 adet suşun *S. aureus* olduğu belirlenirken, 6 adet suşun *Staphylococcus* cinsinin diğer üyeleri oldukları belirlendi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *S. aureus* suşunun izolasyonu ve identifikasyonu akış şeması.

Tablo 4.2.: İzole edilen *S. aureus* suşlarının izolat kodları ve peynir bilgileri.

Peynir Türü	Peynir sıralaması	İzolat Kodu
Lor peynir	1	SAL1
Lor peynir	2	SAL2
Lor peynir	3	SAL3
Beyaz peynir	4	SAP4
Beyaz peynir	5	SAP5
Beyaz peynir	6	SAP6
Yöresel peynir	7	SAY7
Tulum peynir	8	SAT8
Çeçil peynir	9	SAC9
Beyaz peynir	10	-
Beyaz peynir	11	-
Beyaz peynir	12	-
Beyaz peynir	13	-
Lor peynir	14	-
Lor peynir	15	-

Elde edilen veriler neticesinde, 42 farklı peynir türünde yapılan izolasyon ve identifikasyon analizleri sonucunda 9 farklı *S. aureus* ve 5 farklı *L. monocytogenes* türü bakteri elde edildiği gözlemlendi. *L. monocytogenes* izole edilen tüm peynirlerden, aynı zamanda *S. aureus* da tespit edildiği saptandı. Elde edilen tüm izolatların bilgilerinin yer aldığı tablo aşağıda verilmektedir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3.: *L. monocytogenes* ve *S. aureus* izole edilen peynir bilgileri ve izolat kodları.

Peynir Türü	Peynir sıralaması	İzolat kodu
Lor peynir	1	SAL1
Lor peynir	2	SAL2
Lor peynir	3	SAL3
Beyaz peynir	4	SAP4
		LMP4
		SAP5
Beyaz peynir	5	LMP5
		SAP6
		LMP6
Yöresel peynir	6	SAY7
		SAT8
Tulum peynir	7	LMT8
		SAC9
		LMC9

4.1.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Her peynir, dilusyon oranı 1:9 olacak şekilde PBS ile sulandırıldı ve 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar yapılan seri dilusyon solusyonlarından 1 mL alınarak M17 agara (Merck) ekilip statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra mekik görünümündeki koloniler laktik asit bakterisi kabul edildi. 4 numaralı beyaz peynir örneğinde 210×10^6 cfu/mL ile en yüksek sayıda koloni gözlemlenirken; 2 numaralı lor peynir örneğinde 67×10^6 cfu/mL ile en düşük sayıda koloni gözlemlendi. Tüm peynirlerden izole edilen koloni sayıları **Tablo 4.4.**'te sunulmaktadır.

Tablo 4.4.: Peynirlerden elde edilen laktik asit bakteri sayıları.

Peynir Türü	Peynir kod ismi	Peynir numarası	Koloni Sayısı (cfu/mL x 10 ⁻⁶)
Lor peynir	L	1	126
Lor peynir	L	2	67
Lor peynir	L	3	-
Beyaz peynir	P	4	210
Beyaz peynir	P	5	135
Beyaz peynir	P	6	-
Yöresel peynir	Y	7	150
Tulum peynir	T	8	-
Çeçil peynir	Ç	9	90

4.2. Ekstraktın Kuru Madde İçeriği

Rosa canina L. (RC) ekstraktının kuru madde miktarı mg/mL cinsinden hesaplandı. Kurutma işlemi en az üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı. Ekstraktın sulandırma yapılmadan kurutululması sonucu kuru madde içeriği $141.6 \pm 10.0 \text{ mg mL}^{-1}$ tespit edildi (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5.: RC Ekstraktının farklı konsantrasyonlarda (1-1:512) içerdği kuru madde mikratı (mg mL^{-1}). Her bir değer üç tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması olarak gösterildi.

RC Ekstraktı	
Dilasyon Oranı	Kuru Madde (mg mL^{-1})
1:1	141.6 $\pm$ 10.0
1:2	70.8 $\pm$ 5.0
1:4	35.4 $\pm$ 2.50
1:8	17.7 $\pm$ 1.25
1:16	8.8 $\pm$ 0.63
1:32	4.4 $\pm$ 0.31
1:64	2.2 $\pm$ 0.16
1:128	1.1 $\pm$ 0.08
1:256	0.5 $\pm$ 0.04
1:512	0.2 $\pm$ 0.02

4.3. İzolatların Biyofilm Oluşum Kapasitesinin İncelenmesi

İzolatların steril 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında (polistiren), % 2 glukoz içeren TSB besiyeri içerisinde, 37°C sıcaklıkta 24 ve 48 saat boyunca statik koşullar altında inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlandı. İnkübasyonun ardından plakalara kristal viyole ile boyama prosedürü uygulanarak oluşan biyofilmlerin optik yoğunlukları ölçüldü. Ölçülen değerlere göre biyofilmler zayıf orta ve güçlü olmak üzere gruplandırıldı [Stepanovic ve diğerleri, 2000]. Buna göre;

SAC9, LMP5 ve LMC9 kodlu izolatların güçlü; SAL1, SAL3, SAY7 ve LMP6 kodlu izolatların orta düzeyde; SAL2, SAP5, SAP6, SAT8, ve LMT8 kodlu izolatların zayıf düzeyde biyofilm oluşturdıkları; SAP4 ve LMP4 kodlu izolatların biyofilm oluşturmadığı gözlemlendi (Tablo 4.6.).

RC ekstraktının biyofilm oluşumunun biyokontrolü etkinliğinin belirlenmesi için güçlü biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan SAC9, LMP5 ve LMC9 kodlu izolatlar ile çalışmaya devam edildi.

Tablo 4.6.: İzolatların OD₅₇₀ nm değerleri ile biyofilm oluşturma kapasiteleri.

İzolat Kodu	OD ₅₇₀ nm	Biyofilm Oluşturma Kapasitesi
SAL1	0.02	Orta
SAL2	0.009	Zayıf
SAL3	0.03	Orta
SAP4	0	Yok
SAP5	0.007	Zayıf
SAP6	0.007	Zayıf
SAY7	0.01	Orta
SAT8	0.006	Zayıf
SAC9	0.28	Güçlü
LMP4	0	Yok
LMP5	0.44	Güçlü
LMP6	0.01	Orta
LMT8	0.008	Zayıf
LMC9	0.45	Güçlü

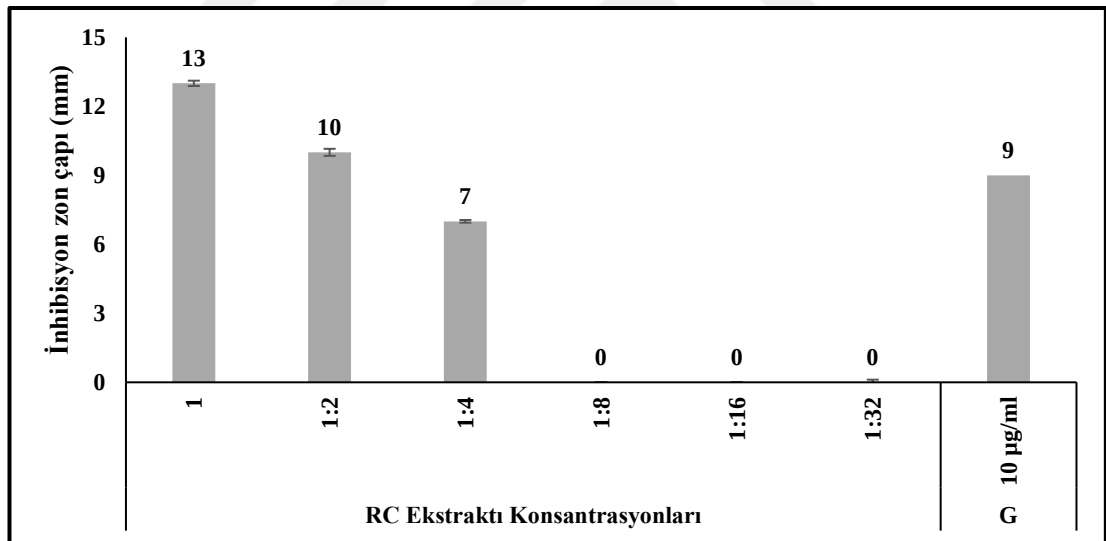
4.4. RC Ekstraktının Antimikrobiyal Etkileri

4.4.1. RC Ekstraktının Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının antibakteriyel etkileri, agar kuyu difüzyonu yöntemi ile SAC9, LMP5 ve LMC9 izolatları üzerinde incelendi. Referans suş olarak *S. aureus* ATCC 6538 numaralı bakteri suşu kullanıldı. Ön kültür işlemleri

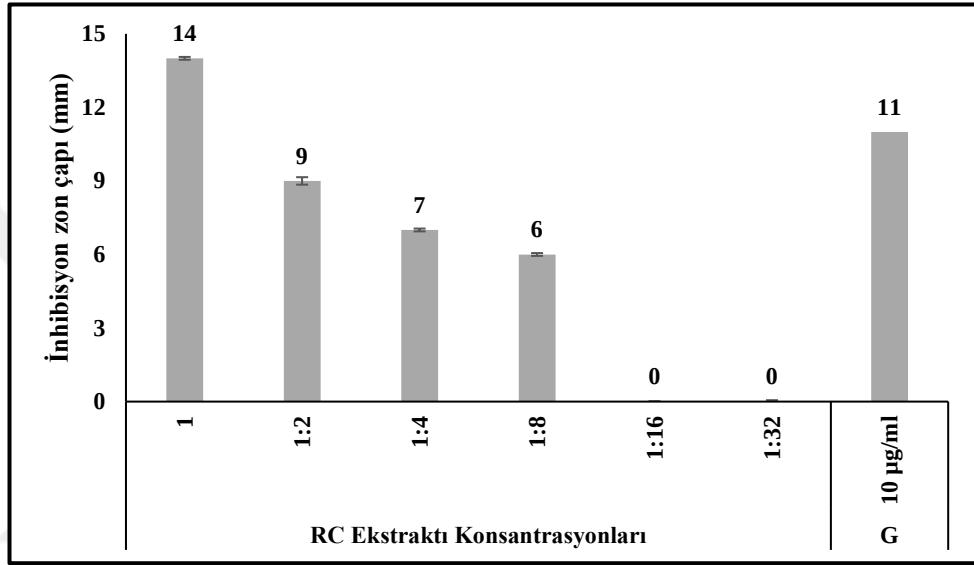
tamamlanarak OD 600 nm değeri 0.1'e ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 µL alınarak LB-A (12 g/L agar) katı besiyerine ekildi. Ekim sonrası agar üzerindeki 6 mm çapındaki kuyulara 40 µL farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt dilüsyonları (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) eklendi. İnkübasyonun ardından, oluşan inhibisyon zonları kuyu çapı (6 mm) da dikkate alınarak ölçüldü. Kontrol olarak 10 µg/mL gentamisin antibiyotiği kullanılarak ekstraktın antimikrobiyal etkinliği ile karşılaştırıldı [Selvadoss et al., 2018].

RC ekstraktının SAC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; 13-7 mm arası inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiğinin (10 µg mL⁻¹) 9 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktın en düşük inhibisyon zon çapı sırasıyla 1:4 oranında seyreltmede (35.4 mg mL⁻¹) 7 mm olarak görüldü. RC ekstraktının seyreltme yapılmadan direkt ve 1:2 sulandırılmış uygulanmasının gentamisin antibiyotiğinden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi (p<0.05) (Şekil 4.8.).



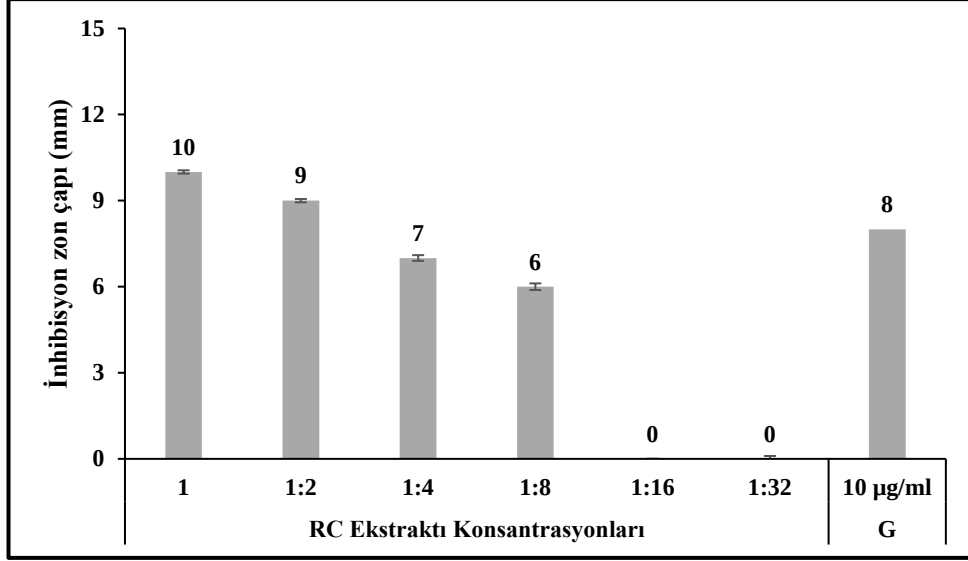
Şekil 4.8: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) SAC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının LMP5 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; 14-6 mm arası inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotığının ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 11 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktın en düşük inhibisyon zon çapı 1:8 oranında seyreltmede (17.7 mg mL^{-1}) 6 mm olarak görüldü. RC ekstraktının seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotığından daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.9.).



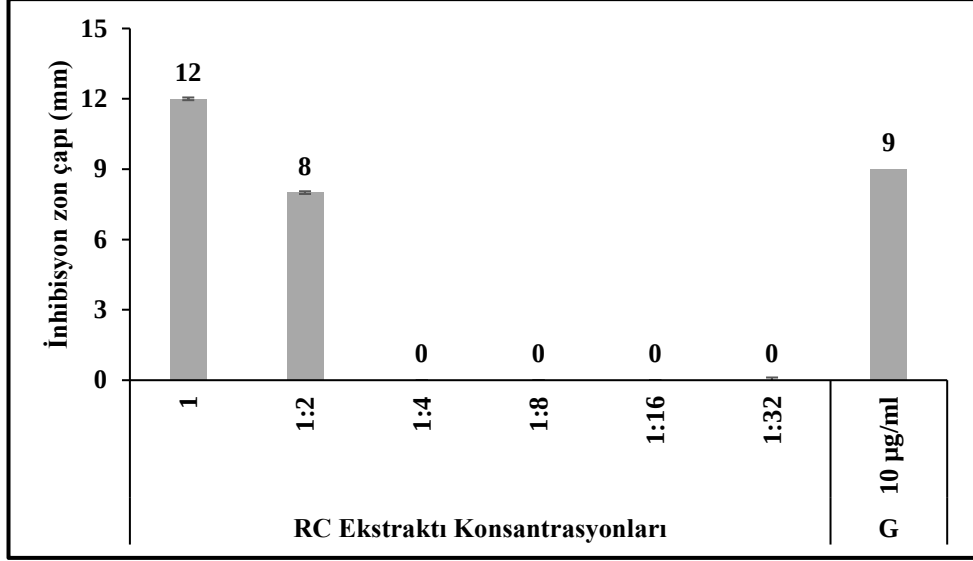
Şekil 4.9.: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) LMP5 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının LMC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; 10-6 mm arası inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotığının ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 11 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktın en düşük inhibisyon zon çapı sırasıyla 1:8 oranında seyreltmede (17.7 mg mL^{-1}) 6 mm olarak görüldü. RC ekstraktının seyreltme yapılmadan ve 1:2 sulandırılmış uygulanmasının gentamisin antibiyotığından daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.10. ve 4.12.).

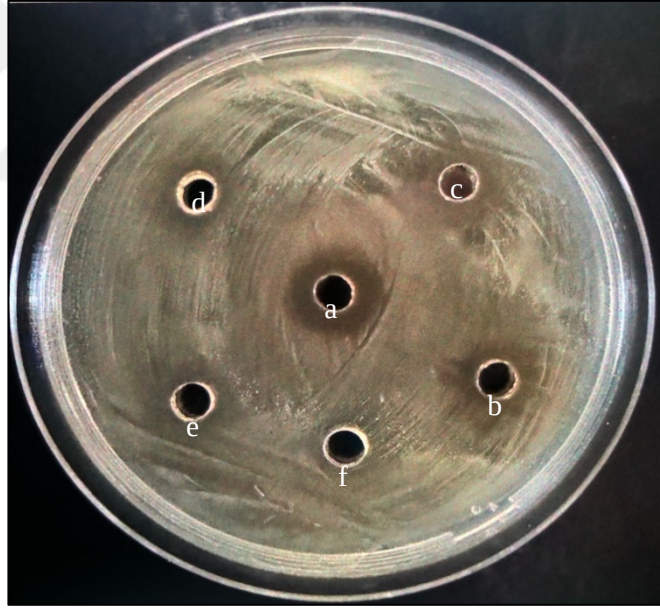


Şekil 4.10.: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) LMC9 numaralı izolat üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; 12-8 mm arası inhibisyon zon çapları olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotikinin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 9 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktın en düşük inhibisyon zon çapı sırasıyla 1:2 oranında seyreltmede (70.8 mg mL^{-1}) 8 mm olarak görüldü. RC ekstraktının seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotikinden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11.: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.12.: RC ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (a: 1, b: 1:2, c: 1:4, d: 1:8, e: 1:16 ve f: 1:32) LMC9 izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin agar kuyu difüzyonu ile belirlenmesi ve oluşan inhibisyon zonları.

RC ekstraktı için antimikrobiyal etkinliğin agar kuyu difüzyonu yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen verilerde seyreltme yapılmadan yapılan uygulamalarda tüm izolatların gentamisin antibiyotiğinden daha fazla ($p < 0.05$). antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlemlenmesi sonucu tez çalışmasına RC

ekstraktının detaylı antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi ekstraktın için minimal inhibisyon ve minimal bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi, antibiyofilm etkisinin ve biyofilm oluşumunun biyokontrolü etkisinin belirlenmesi çalışmaları ile devam edildi.

4.4.2. RC Ekstraktının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

RC ekstraktının SAC9, LMP5 ve LMC9 izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkisi, minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenerek değerlendirildi. Referans suş olarak biyofilm pozitif *S. aureus* ATCC 6538 numaralı bakteri suşu kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt çözeltileri (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) kullanılarak, final yoğunlukları OD 600 nm değeri 0.1 olacak şekilde ayarlanan bakteriler 96 kuyulu mikrotitrasyon plakalarındaki kuyulara eklendi ve 24 saat statik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kuyulardan alınan örnekler FTS içerisinde seyreltildi ve LB katı besiyerine ekilerek 24 saat inkübe edildi. Sonuçta, oluşan koloni sayıları sayıldı ve koloni sayısının 30-300 arasında olmasına özen gösterildi [Breed and Dotterer, 1916]. Ekstrakt uygulanmayan kontrol grubundan elde edilen sonuçlarla ekstraktın bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisi (%) hesaplandı. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK), bir mikroorganizmanın büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak tanımlanırken, minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK), mikroorganizmanın büyümesini tamamen engelleyen en düşük konsantrasyon olarak kabul edildi [Andrews, 2001]. RC ekstraktının bakteriler üzerindeki MİK ve MBK değerleri bu tanımlara göre belirlendi.

RC ekstraktının SAC9 izolatı üzerinde bakterisidal etkinliğinin 17.7 mg mL⁻¹ (1:8) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 8.8 mg mL⁻¹ (1:16) konsantrasyonda % 85 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın SAC9 izolatı üzerinde MİK değeri % 8.4 inhibisyon oranıyla 1.1 mg mL⁻¹ (1:128) olarak belirlendi. RC ekstraktının SAC9 izolatı üzerinde % 50, % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK50-MİK70 ve MİK90) sırasıyla 1.75, 3.37 ve 6.49 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Tablo 4.7.).

RC ekstraktının LMP5 izolatı üzerinde bakterisidal etkinliğinin 70.8 mg mL⁻¹ (1:2) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 35.4 mg mL⁻¹ (1:4) konsantrasyonda % 55 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın LMP5

izolatı üzerinde MİK değeri % 20 inhibisyon oranıyla 2.2 mg mL⁻¹ (1:64) olarak belirlendi. RC ekstraktının LMP5 izolatı üzerinde % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK50, MİK70 ve MİK90) sırasıyla 18.4, 48 ve 125.5 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Tablo 4.7.).

RC ekstraktının LMC9 izolatı üzerinde bakterisidal etkinlik direkt uygulamada 141.6 mg mL⁻¹ (1) konsantrasyonunda tespit edildi. Ekstraktın 70.8 mg mL⁻¹ (1:2) konsantrasyonda % 39 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın LMC9 izolatı üzerinde MİK değeri % 13 inhibisyon oranıyla 2.2 mg mL⁻¹ (1:64) olarak belirlendi. RC ekstraktının LMC9 izolatı üzerinde % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK50, MİK70 ve MİK90) sırasıyla 10.24, 25.5 ve 63.46 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Tablo 4.7.).

RC ekstraktının pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde bakterisidal etkinliğinin (%100 inhibisyon) 70.8 mg mL⁻¹ (1:2) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 35.4 mg mL⁻¹ (1:4) konsantrasyonda % 62 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde MİK değeri % 24 inhibisyon oranıyla 2.2 mg mL⁻¹ (1:64) olarak belirlendi. RC ekstraktının *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK50, MİK70 ve MİK90) sırasıyla 8.55, 19.03 ve 42.34 mg mL⁻¹ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, SAC9 suşunun referans *S. aureus* suşu ve diğer iki *Listeria* izolatları olan LMC5 ve LMC9 suşları ile karşılaştırıldığında en hassas suş olduğu belirlendi. *Listeria* izolatlarının ise referans suşa göre ekstrakt uygulamalarına daha dirençli olduğu görüldü. (Tablo 4.7.).

Suşlar	MİK (mg mL ⁻¹)	MİK50 (mg mL ⁻¹)	MİK70 (mg mL ⁻¹)	MİK90 (mg mL ⁻¹)	MBK (mg mL ⁻¹)
SAC9	1.1	1.75	3.37	6.5	17.7
LMP5	2.2	18.42	48.08	125.5	141.6
LMC9	2.2	10.24	25.5	63.5	70.8
<i>S. aureus</i> ATCC	2.2	8.55	19.03	42.34	70.8

Tablo 4.7.: RC ekstraktının SAC9, LMP5, LMC9 izolatları ve *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde Minimal İnhibisyon (MİK, MİK50, MİK70 ve MİK90, mg mL⁻¹) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) (mg mL⁻¹).

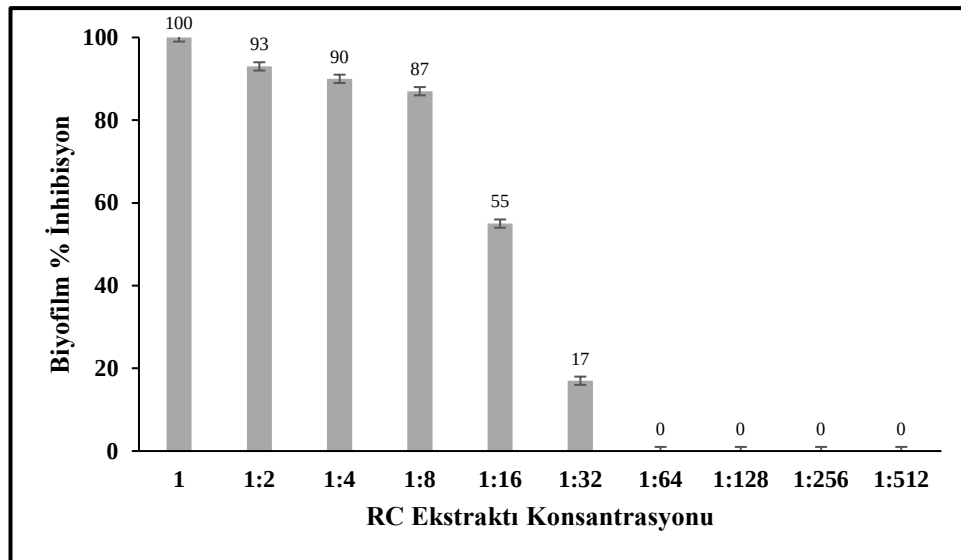
4.5. RC Ekstraktının Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi

RC bitkisi ekstraktının, bakterilerin oluşturdukları biyofilmin ilk oluşumunu engellediği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunu tanımlamak için minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) testi uygulandı.

Bunun için bakteriler, %2 glukoz içeren TSB besiyerine eklenerek uygun koşullarda ön kültüre alındı. Final bakteri yoğunluğu OD 600 nm değeri 0.1 olacak şekilde her mikrolaka kuyusuna 100 µL kültür eklendi. Aynı hacimde, farklı konsantrasyonlarda (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ekstrakt dilüsyonları da ilgili kuyulara eklendi ve mikrolaka inkübatöre konuldu [Sánchez et al., 2016].

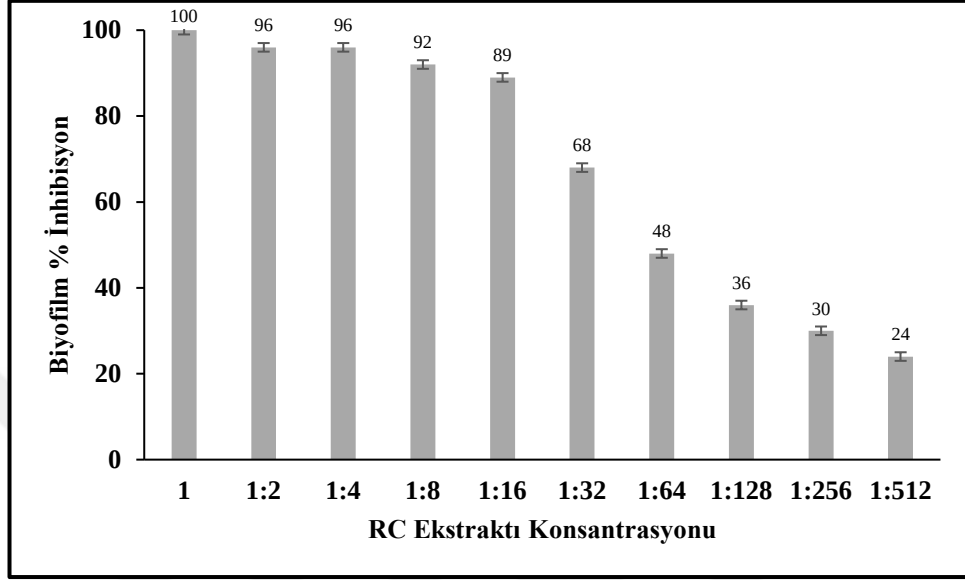
Uygun boyama ve yıkama adımlarından sonra, etanol çözeltisi yeni bir plakaya transfer edildi ve 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbans ölçümleri yapıldı [Akbas ve Çağ, 2016]. Elde edilen sonuçlar, minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyon (MBİK) (%) olarak hesaplandı [Kang et al., 2018].

RC ekstraktının SAC9 izolatı üzerinde biyofilm oluşum inhibisyonunun 8.8 mg mL⁻¹ (1:16) konsantrasyonuna kadar devam ettiği görüldü. Minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonunun (MBİK) 4.4 mg mL⁻¹ (1:32) olduğu ve ekstraktın %17 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.).



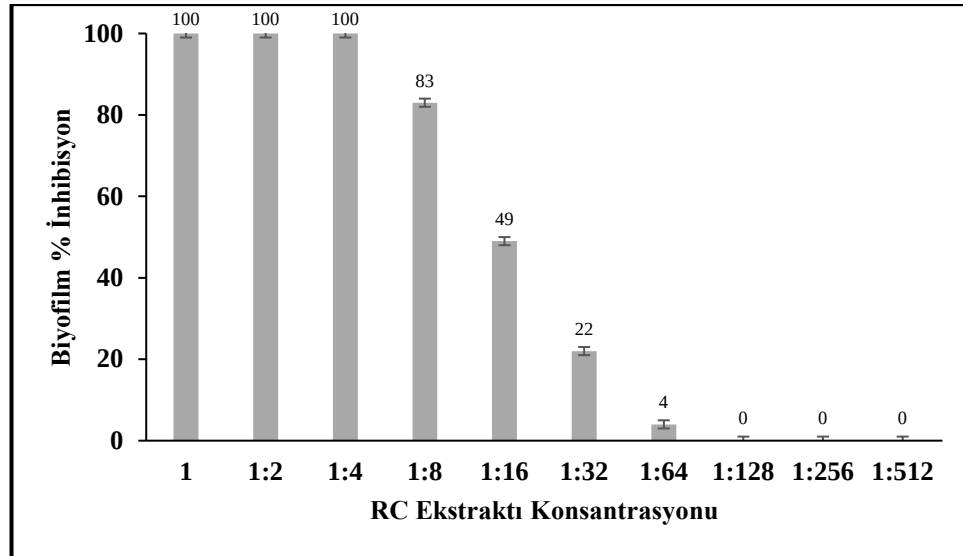
Şekil 4.13.: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) SAC9 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının LMP5 izolatı üzerinde biyofilm oluşum inhibisyonunun 8.8 mg mL^{-1} (1:16) konsantrasyonuna kadar %89 inhibisyon etkinliği ile devam ettiği görüldü. RC ekstraktının LMP5 izolatı üzerinde MB K değerinin %24 inhibisyonla 0.2 mg mL^{-1} (1:512) olduğu tespit edildi (Şekil 4.14.).



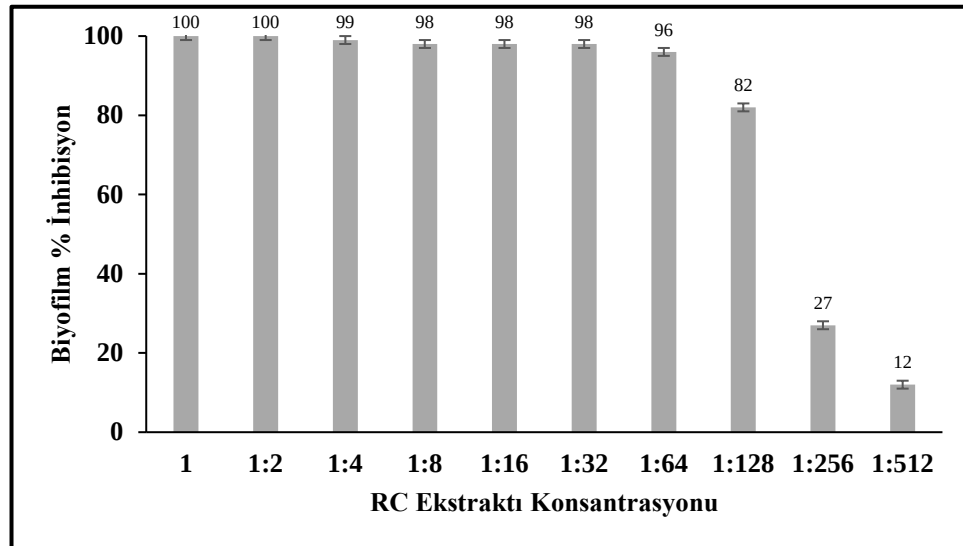
Şekil 4.14.: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) LMP5 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının LMC9 izolatı üzerinde biyofilm oluşum inhibisyonunun 35.4 mg mL^{-1} (1:4) konsantrasyonuna kadar %100 inhibisyon etkinliği ile devam ettiği görüldü. RC ekstraktının LMC9 izolatı üzerinde MB K değeri %22 inhibisyonla 4.4 mg mL^{-1} (1:32) olarak tespit edildi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15.: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) LMC9 izolatı üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

RC ekstraktının pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde biyofilm oluşum inhibisyonunun 35.4 mg mL^{-1} (1:4) konsantrasyonuna kadar %100 inhibisyon etkinliği ile devam ettiği görüldü. RC ekstraktının pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde MBİK değerinin %24 inhibisyonla 0.2 mg mL^{-1} olduğu tespit edildi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16.: RC ekstraktının farklı dilüsyon oranlarının (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) *S. aureus* 6538 bakterisi üzerinde biyofilm % inhibisyon değerleri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Gıda işleme tesislerinde yetersiz hijyen uygulamaları, gıda ürünlerinin patojenlerle kontaminasyonuna ve bunun sonucunda tüketicilerin sağlığını tehdit eden risklere yol açabilir. Patojen bakterilerin gıda ürünlerine bulaşmasının en önemli nedenlerinden biri, üretim tesislerinde hijyen kurallarının yeterince uygulanmamasıdır. Bu sorunun temeli, yeterli uygulandığı düşünülen hijyen kurallarına rağmen bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri sebebi ile ortamdan uzaklaştırılmalarındaki güçlükte yatmaktadır.

Biyofilm, bakteri hücrelerinin bir yüzeye yapışarak hücre dışı polimerik maddeler (EPS) salgılamasıyla oluşturduğu bir savunma matrisidir. Bu biyofilm, bakterilerin yüzeyde tutunmasını ve hayatta kalmasını sağlar. Peynir üretim hattı ve üretim öncesinde süt ortamıyla temas eden yüzeylerde en sık rastlanan bakteriler arasında *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* bulunmaktadır. Bu bakteriler, uygun koşullarda biyofilm oluşturarak üretim ekipmanlarında ve tesis yüzeylerinde kalıcı kontaminasyona neden olabilirler. Bu durum, hijyenik olmayan bir ortamda üretilen gıda ürünlerinin patojenlerle kontamine olmasına ve sonuç olarak tüketiciler için ciddi sağlık riskleri oluşturmaya yol açar.

Biyofilm kaynaklı mikrobiyal kontaminasyonun problem olduğu pek çok gıda üretim alanında, kontaminasyonun kontrol altına alınması ve ortadan kaldırılması için genellikle çevreyi kirleten kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu nedenle, doğal bileşenler içeren bitkisel ekstraktların kullanımı giderek daha fazla ilgi çekmektedir.

Tüketicilerin temiz içerikli ürünlere olan talebinin artması, bu tür bitkisel ekstraktlar veya bunlarla üretilen işlenmiş ürünlere olan ilgiyi de artırmaktadır. Günümüzde daha bilinçli tüketim alışkanlıklarına sahip insanların bu taleplerini karşılamak için sanayiciler ve bilim insanları kapsamlı araştırmalar yapmaktadır.

Günümüzde, mikroorganizmaların klasik antibiyotiklere karşı daha duyarlı hale gelmeleri sebebi ile bilim camiası yeni antimikrobiyal ajan arama çalışmalarını hız kesmeden devam etmektedir. Bu arayışta bitki ekstraktlarının antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılması, patojenlerin direnç mekanizmalarına meydan okuyabildiğine dair birçok çalışma mevcuttur [Guglielmi et al., 2020]. Nar, lavanta, ekinezya ve ortalıca bitkilerinden elde edilen ekstraktların *K. pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir [Zazharskyi et al., 2019]. Zerdeçal ve muskat ekstraktlarının ise *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları gözlemlenmiştir [Romeiro et al., 2024]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, tarçın, papatya, kadife çiçeği ve adaçayı olmak üzere dört etanolik bitki ekstraktının *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium*'a karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada, papatya, adaçayı ve tarçından elde edilen etanolik ekstrakt karışımının, *L. monocytogenes*'e karşı en güçlü antibiyofilm aktivitesini gösterdiği gözlemlenmiştir [El-Sawy, 2024].

Kurutulmuş meyvelerden elde edilen ekstraktlar ile birçok potansiyel antimikrobiyal ve antibiyofilm etkiyi araştırma çalışması yapılmaktadır. 2021 yılında Öz ve ekip arkadaşları tarafından yayınlanan çalışmaya göre, kuşburnu ekstraktının *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, ve *P. aeruginosa* gibi patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır [Öz et al.; 2021]. Başka bir çalışmada ise bu mikroorganizmalara ek olarak *Enterococcus faecalis*, *S. enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* ve bir maya türü olan *Candida albicans* üzerinde de antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Miljković et al., 2024]. Rovna ve arkadaşlarının yayınladığı rapora göre; kuşburnu ekstraktının *E. coli*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir [Rovná et al; 2020].

Bu tez çalışması kapsamında hali hazırda yerel pazar ve marketlerden satışı yapılan peynir örneklerinden farklı yöntemler kullanılarak biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olan *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakteri suşları izole edilmiştir. Elde edilen isolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenerek; güçlü biyofilm oluşturan isolatlar üzerinde kuşburnu (RC) ekstraktının antimikrobiyal etkisi ile biyofilm oluşumunu biyokontrolü çalışmaları değerlendirilmiştir.

Beyaz peynir, lor peynir, yöresel peynir, tulum peynir ve çeçil peynir olmak üzere 5 farklı türden toplamda 42 adet peynir örneğinden *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve laktik asit bakterileri olmak üzere farklı mikroorganizmalar çeşitli yöntemler kullanılarak izole edilmiştir.

S. aureus cinsi mikroorganizmaların izolasyonu için peynir örnekleri PBS ile sulandırılıp kromojenik agar olan Baird-Parker agar üzerine yayma plak yöntemi kullanılmıştır. Baird-Parker agar üzerinde etrafında zon oluşmuş olan siyah koloniler *S. aureus* şüphelisi olarak değerlendirilmiş ve Rabbit-Plasma Fibrinogen agara bir öze ucu alınmış şüpheli koloni düz bir çizgi şeklinde ekilmiştir. Etrafında zon oluşturmuş olan SAL1, SAL2, SAL3, SAP4, SAP5, SAP6, SAY7, SAT8 ve SAC9 kodlu izolatlar *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir. Doğrulama için ise Gram boyama testi uygulanmıştır. Kromojenik agarlar yardımı ile izole edilmiş olan *S. aureus* suşları MALDI-TOF cihazı ile identifiye edilmiş ve *S. aureus* oldukları doğrulanmıştır.

L. monocytogenes cinsi mikroorganizmaların izolasyonu klasik yöntem ve VIDAS LMO2 ve VIDAS LDUO yöntemleri olmak üzere üç farklı yöntem izlenerek mikroorganizmalar tayin edilmiştir.

Klasik yöntem ve VIDAS LMO2 yöntemi için peynir örnekleri half Fraser broth ile sulandırılmıştır. Klasik yöntem için direkt *L. monocytogenes* için kromojenik agarlar olan ALCOA ve PALCAM agarlara ekim yapılmıştır.

VIDAS LMO2 yöntemi için ise Fraser broth tüpüne half Fraser broth süspansiyonundan geçiş yapıp, inkübasyonu dolan Fraser broth tüpünden süspansiyon alınarak VIDAS cihazına okutulmuştur. Tv değeri ≥ 1 veren numuneler *L. monocytogenes* şüphelisi olarak değerlendirilmiş ve ilgili numune süspansiyonlarından alınarak kromojenik agarlar olan ALCOA ve PALCAM agarlara ekim yapılmıştır.

VIDAS LDUO yöntemi için peynir örnekleri *Listeria* Xpress broth ile sulandırılmıştır. İnkübasyon sonrası *Listeria* Xpress brohtan LDUO brotha geçiş yapılmış ve inkübasyonu dolan LDUO broth tüpünden süspansiyon alınarak VIDAS cihazına okutulmuştur. Tv değeri ≥ 1 veren numuneler *L. monocytogenes* şüphelisi olarak değerlendirilmiş ve ilgili numune süspansiyonlarından alınarak kromojenik agarlar olan ALCOA ve PALCAM agarlara ekim yapılmıştır.

Klasik yöntem, VIDAS LMO2 ve VIDAS LDUO yöntemlerinde çizgi ekim yapılan ALOA ve PALCAM petrileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. ALOA petrilerinde zonlu, mavi koloniler ve PALCAM petrilerinde görülen zeytin görünümlü, ortası çukur, siyah koloniler *L. monocytogenes* şüphelisi olarak kabul edilmiş ve doğrulama testi olan API testi uygulanmak üzere TSA agara alınmıştır. API sonuçları API^{web} tarayıcısında değerlendirilmiş ve LMP4, LMP5, LMP6, LMT8 ile LMC9 kodlu izolatlar *L. monocytogenes* olarak tayin edilmiştir. Aynı zamanda, *L. monocytogenes*'in hemoliz aktivitesi doğrulama aracı olarak kullanılmış ve Columbia agara ekim yapılmıştır. Renk değişikliği gösteren agarlarda β -hemoliz aktivitesinin gözlemlendiği, dolayısıyla LMP4, LMP5, LMP6, LMT8 ve LMC9 kodlu izolatların *L. monocytogenes* oldukları doğrulanmıştır.

Uygun dilüsyon serileri kullanılarak M17 agara dökme plak yöntemi ile peynir örnekleri çalışılmış ve inkübasyon sonunda petride gözlemlenen mekik görünümlü koloniler laktik asit bakterisi olarak kabul edilmiştir.

Bu tez çalışmasında toz haline getirilen kuşburnu bitkisi, 1:10 [w/v] oranında %50 etanol ile karıştırılıp uygun adımlar takip edilerek RC ekstraktı elde edilmiştir [Rovna et al., 2015]. Elde edilen ekstraktın içerdiği kuru madde miktarı 141.6 mg mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışması kapsamında, ileri testlere devam etmeden önce elde edilen *S. aureus* ve *L. monocytogenes* olmak toplamda 14 farklı izolatın biyofilm oluşum kapasiteleri incelenmiştir. Bunun için izolatlar steril 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında, %2 glukoz içeren TSB besiyeri içerisinde inokule edilmiştir [Stepanovic et al., 2000]. SAC9, LMP5 ve LMC9 kodlu izolatların güçlü; SAL1, SAL3, SAY7 ve LMP6 kodlu izolatların orta düzeyde; SAL2, SAP5, SAP6, SAT8, ve LMT8 kodlu izolatların zayıf düzeyde biyofilm oluşturdıkları; SAP4 ve LMP4 kodlu izolatların biyofilm oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.6.). RC ekstraktının biyofilm oluşumunun biyokontrolü etkinliğinin belirlenmesi için güçlü biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan SAC9, LMP5 ve LMC9 kodlu izolatlar ile çalışmaya devam edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında RC ekstraktının antimikrobiyal etkisi agar kuyu difüzyonu yöntemi ile incelenmiştir. RC ekstraktının SAC9, LMP5 ile LMC9 izolatları olmak üzere 3 farklı izolat ve güçlü biyofilm oluşturma aktivitesi gösterdiği bilinen *S. aureus*

ATCC 6538 suşu üzerinde antimikrobiyal etkisi incelenmiştir ve gentamisin antibiyotiği uygulamaları ile karşılaştırılmıştır.

SAC9 izolatına karşı $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamisin antibiyotiğinin uygulaması sonucu (9 mm) RC ekstraktının direkt uygulamasından (13 mm) daha düşük etki gösterdiği belirlenmiştir. RC ekstraktının 1:2 oranda seyreltilerek uygulamasının gentamisine yakın etki gösterdiği (10 mm) belirlenmiştir ($p<0.05$). RC ekstraktının 1:4 konsantrasyonda uygulamasında antimikrobiyal etki gözlenirken (7 mm), daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki saptanmamıştır.

$10 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamisin antibiyotiğinin LMP5 izolatına karşı uygulaması sonucu (11 mm) RC ekstraktının direkt uygulamasından (14 mm) daha düşük antimikrobiyal etki gözlenmiştir ($p<0.05$). RC ekstraktının 1:16 ve 1:32 konsantrasyonda uygulamaları sonucu antimikrobiyal etki saptanmamıştır. RC ekstraktının 1:2 oranda seyreltilerek uygulamasında 9 mm inhibisyon zon çapı görülürken, 1:4 konsantrasyonda uygulamasında 7 mm ve 1:8 konsantrasyonda uygulamasında 6 mm inhibisyon zon çapı tespit edilmiştir.

LMC9 izolatına karşı $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamisin antibiyotiğinin uygulaması sonucu (8 mm) RC ekstraktının direkt uygulamasından (10 mm) daha düşük etki gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). RC ekstraktının 1:2 oranda (9 mm) ve 1:4 (7 mm) oranda seyreltilerek uygulamasının gentamisine yakın etki gösterdiği belirlenmiştir. RC ekstraktının 1:16 ve 1:32 konsantrasyonda uygulamaları sonucu antimikrobiyal etki saptanmamıştır.

$100 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamisin antibiyotiğinin *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı uygulaması sonucu (9 mm) RC ekstraktının direkt uygulamalarından daha düşük (12 mm) etki gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). RC ekstraktının 1:2 konsantrasyonda uygulaması sonucu 8 mm inhibisyon zon çapı gözlenirken, ileri konsantrasyonların uygulaması sonucu herhangi bir antimikrobiyal etki gözlenmemiştir.

Sonuçta RC ekstraktı için en yüksek antimikrobiyal etki LMP5 izolatı üzerinde (14 mm) görülürken, en düşük antimikrobiyal etki LMC9 (10 mm) izolatı üzerinde görülmüştür. Uygulanan ekstrakt konsantrasyonu azaldıkça inhibisyon zon çapının azaldığı görülmüştür.

Rovná ve arkadaşları (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, etanol ile mikrodalga yöntemi kullanmadan hazırlanan kuşburnu ekstraktlarının, *E. coli*, *K.*

oxytoca, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *C. perfringens* ve *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Kontrol olarak gentamisin (10 µg/disk) ve distile su kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarında kuşburnu ekstraktının antimikrobiyal etkisi, *E. coli* üzerinde 14.33-15.67 mm, *K. oxytoca* üzerinde 10.67-12.00 mm, *P. aeruginosa* üzerinde 9.33-10.67 mm ve *B. cereus* üzerinde 8.00-8.67 mm çapında inhibisyon zonları tespit edilmiştir. *C. perfringens* için 4.00-5.33 mm ve *L. monocytogenes* için 5.67-6.67 mm arasında inhibisyon zonları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, RC ekstraktının *L. monocytogenes* izolatları (LMP5: 14-6 mm; LMC9: 10-6 mm) üzerinde daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun sebebinin kuşburnu ekstraktının bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin, kuşburnu bitkisi ve bakteri türüne veya ekstraksiyon yöntemine ve böylece farklı bileşenlere sahip olabilecek ekstraktın etkinliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Ghendov-Moşanu ve arkadaşları (2018) ise kuşburnu ve alıç meyvesi özlerini %50 etanol-su karışımı kullanarak hazırlamış ve *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda kuşburnu ekstraktının *S. aureus* üzerinde 16 mm, *E. coli* üzerinde 10 mm ve *K. pneumoniae* üzerinde 9 mm çapında inhibisyon zonları oluşturduğu ve bu değerlerin önceki çalışmalarda elde edilenlerden daha yüksek değerler sunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, önceki çalışmalarda da çözücü olarak %50 etanol-su kullanılmasına rağmen; Ghendov-Moşanu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada RC ekstraktının *S. aureus* üzerinde bu tez çalışmasında elde edilen değerlerden daha yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu tespit edilmiştir (SAC9: 13-7 mm; *S. aureus* ATCC 6538: 12-8 mm). Kullanılan çözücünün su miktarının, kuşburnunun antimikrobiyal etkisini etkileyen bir faktör olduğu düşünülmektedir. Tez çalışması genel olarak değerlendirildiğinde elde edilen RC ekstraktının peynir örneklerinden izole edilen ortam izolatları üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunun görülmesi ile RC ekstraktının kolay elde edilen, ucuz maliyetli bir alternatif antimikrobiyal ajan olabileceği düşünülmektedir.

RC ekstraktının SAC9, LMP5 ile LMC9 ve *S. aureus* ATCC 6538 bakteri suşları üzerinde minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) belirlenmiştir. SAC9 izolatı için MİK değeri 1.1 mg mL⁻¹ 1:128, % 8.4 inhibisyon, LMP5 izolatı (% 20 inhibisyon) ve LMC9 izolatı (%13 inhibisyon) için MİK değeri 2.2 mg mL⁻¹ (1:64) olarak tespit edilmiştir. RC ekstraktının *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde MİK değeri % 24 inhibisyonla

2.2 mg mL⁻¹ (1:64) olarak belirlenmiştir. Bakterilerin % 50, % 70 ve % 90 oranlarında inhibe oldukları konsantrasyonlar hesaplanmıştır. MBK değeri SAC9 izolatı için 17.7 mg mL⁻¹, LMP5 izolatı için 141.6 mg mL⁻¹ ve LMC9 izolatı ile *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi için 70.8 mg mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. MİK50, MİK70 ve MİK90 değerleri SAC9 izolatı için sırasıyla 1.75, 3.37, 6.5 mg mL⁻¹ olarak; LMP5 izolatı için sırasıyla 18.42, 48.08, 125.5 mg mL⁻¹ olarak; LMC9 izolatı için sırasıyla 10.24, 25.5, 63.5 mg mL⁻¹ olarak ve *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi için sırasıyla 8.55, 19.03, 42.34 mg mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. RC ekstraktına karşı en duyarlı bakterinin en düşük MİK50-70-90 değerleriyle SAC9 izolatı olduğu belirlenmiştir. LMP5 izolatı, yüksek MBK değeri ile RC ekstraktına en dirençli bakteri olarak belirlenmiştir. Uygulanan ekstrakt konsantrasyonu azaldıkça bakteriyel inhibisyonun azaldığı gözlemlenmiştir.

Bakterilerin düşük dozlarda antimikrobiyal maddelere maruz kalması, direnç geliştirmelerine neden olabilir. Bu nedenle, antimikrobiyal etkisi olan bileşiklerin bakteriler üzerindeki MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi, bakteriyel üremenin engellenmesi için gerekli doğru antimikrobiyal madde miktarını tespit etmede büyük önem arz etmektedir. [Gülmez, 2014].

Mevcut literatürde, RC ekstraktı ile yapılan araştırmalarda farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktların içeriğinde çeşitli fitokimyasal bileşenlerin bulunduğu tespit edilmiştir.

Stănilă ve arkadaşları (2015), öğütülmüş meyve ile asitlendirilmiş metanolün (% 0.3 HCl (v/v)) ultraturaks ile karıştırılıp süzülmesinden elde edilen RC ekstraktının fenolik bileşiklerini HPLC-DAD-ESI/MS metodu ile tanımlamıştır. Tanımlanan fenolik bileşiklerin ana sınıfları fenolik asitler, flavonlar, flavan-3-oller ve ayrıca antosiyaninler olmak üzere toplamda 19 farklı türde fenolik bileşik tespit etmişlerdir [Stănilă et al., 2015].

Başka bir çalışmada, RC meyvelerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu artırmak amacıyla ekstraksiyon süresi, ultrasonik güç ve malzeme-su oranı gibi değişkenler kullanılmıştır. Analizler sonucunda, örneklerin toplam fenolik içeriği ile gallik asit (hidroksibenzoik asit türevlerine ait), antosiyaninler, fenolik asitler ve tirozol türevlerinin, ekstraktların in vitro antioksidan potansiyeliyle en fazla ilişkilendirilen bileşikler olduğu belirlenmiştir [Nicolescu et al., 2022].

Peña ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada, 1 gram RC bitkisini ekstraksiyon çözücüsü (%90 metanol, %9 su ve %1 formik asit) kullanarak sonikizasyon metodu ile homojenize ederek elde ettikleri RC ekstraktının HPLC-DAD-ESI-MS/MS yöntemiyle ham protein, mineraller ve fenolik bileşikler gibi besin maddeleri ile askorbik asit gibi fonksiyonel özellikleri ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Araştırma, ekstraktın başta askorbik asit, flavonoller ve antioksidan aktivite olmak üzere yüksek miktarda biyoaktif bileşen içerdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), kuprik indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve 2,2-difenil radikal (DPPH) yöntemlerini kullanarak, antioksidan aktivite ile flavonoller ve kateşin gibi renksiz bileşiklerin konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunduğunu belirtmişlerdir [Peña et al., 2023].

RC ekstraktının, SAC9, LMP5 ve LMC9 izolatlarının oluşturdukları biyofilm oluşumunu engellediği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunu tanımlamak için minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) testi uygulanmış ve uygulamalar *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi ile karşılaştırılmıştır.

Bunun için, izolatlar ve bakteri eklenmiş %2 glukoz içeren TSB besiyeri ile aynı hacimde farklı konsantrasyonlarda (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ekstrakt dilüsyonları ilgili kuyulara eklenmiş ve 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında 24 saatlik inkübasyonlar sonucu absorbans ölçümleri yapılarak minimal biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) (%) hesaplanmıştır.

SAC9 izolatı için MBİK değeri % 17 inhibisyonla 4.4 mg mL^{-1} (1:32); LMP5 izolatı için MBİK değerinin % 24 inhibisyonla 0.2 mg mL^{-1} (1:512) ve LMC9 izolatı için ise MBİK değerinin %22 inhibisyonla 4.4 mg mL^{-1} (1:32) olarak tespit edilmiştir. RC ekstraktının *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde MBİK değeri % 24 inhibisyonla 0.2 mg mL^{-1} (1:512) olarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler, LMP5 izolatı ile *S. aureus* ATCC 6538 için MBİK değerinin eşit olduğunu göstermektedir. Ayrıca, SAC9 izolatı ile LMC9 izolatı arasında da MBİK değerinin aynı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, belirli izolatların antibakteriyel etkinliğinin karşılaştırılmasında önemli bilgiler sunmaktadır. Biyofilmlerin kantitatif kristal viyole boyaması, RC ekstraktının biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde, doza bağlı olarak engellediğini açıkça göstermektedir.

RC ekstraktının SAC9 izolatu üzerindeki MİK ve MBK değerleri sırasıyla 1.1 ve 17.7 mg mL⁻¹, biyofilm oluşumunda SAC9 izolatu üzerindeki MBİK değeri ise 4.4 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. RC ekstraktının LMP5 izolatu üzerindeki MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2.2 ve 70.8 mg mL⁻¹, biyofilm oluşumunda LMP5 izolatu üzerinde MBİK değeri ise 0.2 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. RC ekstraktının LMC9 izolatu üzerinde MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2.2 ve 70.8 mg mL⁻¹, biyofilm oluşumunda LMC9 izolatu üzerindeki MBİK değeri ise 0.2 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

RC ekstraktının kontrol grubu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerinde MİK ve MBK değerleri sırasıyla 2.2 ve 70.8 mg mL⁻¹, biyofilm oluşumunda *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi üzerindeki MBİK değeri ise 0.2 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

MİK altı RC ekstraktı seviyesi (0.2 mg mL⁻¹) LMP5 izolatu için tıpkı *S. aureus* ATCC 6538 bakterisi gibi biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği gözlemlenmiştir.

Mevcut literatürde RC ekstraktının peynirden izole edilen *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde biyofilm oluşumu biyokontrolü etki araştırması olmadığı için farklı bitki ekstraktlarının *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterileri üzerindeki antibiyofilm etkinliği yapılan farklı çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Živković ve arkadaşları (2015), kuřburnu yapraklarının metanolik ekstraktlarının *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini incelemiřtir. Ekstraktın her iki bakteriye karřı MİK (1:4 ve 1:8) deęerinin in vitro biyofilm büyümesini inhibe ettięi deęerlendirilmiřtir. Bu çalıřmada ayrıca kuřburnu yapraklarının metanolik ekstraktındaki flavonoid bileřenlerini incelemiř ve rutin, hiperozit ve izokuersetin bulmuřlardır [Živković et al., 2015].

Abdelbaky ve arkadaşları (2021), *Rosa gallica* var. *aegyptiaca* yapraklarının kurutulmuş tozunu (100 g/500 mL) n-hekzan, kloroform, metanol, hidrometanol (%80) ve su ile ayrı ayrı çalkalayıp Whatman 1 numaralı filtre kağıdı üzerinden süzölerek elde ettikleri ekstraktlar ile *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelemişlerdir. İncelenen beş yaprak ekstresi arasında, hidrometanol %80 ekstresi tüm mikrobiyal suşlara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hidrometanol %80 ekstresinin 10 mg/disk uygulamasının *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkinin her iki

bakteri için de 17 mm çapında olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında RC ekstraktının direkt uygulaması, en fazla 14 mm ile LMP5 numaralı izolatta tespit edildi.

Chroho ve arkadaşları (2022), kurutulmuş *Rosa damascena* ieğinden Soxhlet cihazı kullanarak etanol (%70) ile elde ettikleri ekstraktın *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *S.typhimirium* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktiviteyi araştırmışlardır. Yapılan araştırmada *Rosa damascena* ekstraktının *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri zerindeki MİK değeri 20.83 mg mL⁻¹ bulunmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen verilere kıyasla Chroho ve arkadaşlarının (2022) tespit ettikleri MİK değeri daha yüksektir.

Mevcut literatürde RC ekstraktının peynirden izole edilen *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde antimikrobiyal, antibiyofilm veya biyofilm oluşumunun biyokontrolü etkinliğini inceleyen bir çalışma yoktur. Bu alışma literatürde bir RC bitkisi ekstraktı ile yapılan ilk antimikrobiyal ve biyofilm oluşumunun biyokontrolü etkinliği çalışması olduğu için literatürdeki bitkisel ekstraktların biyofilm kontrolünde kullanım stratejilerine katkı sağlayacaktır.

Sonuçlarımız, RC ekstraktının canlı bakterileri ve *S. aureus* ile *L. monocytogenes* biyofilm oluşumunu engellediğini ve gıda endüstrisinde biyofilmle ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisine yeni bir yaklaşım getirdiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., & Rørvik, L. M. (2000). "Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*." *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00204-0)
- Abdelbaky, A. S., Mohamed, A. M. H. A., & Alharthi, S. S. (2021). "Antioxidant and antimicrobial evaluation and chemical investigation of *Rosa gallica* var. *Aegyptiaca* leaf extracts." *Molecules*, 26(21), 6498. <https://doi.org/10.3390/molecules26216498>
- Abdullah, D., & Calicioglu, M. (2013). "Survival of *Listeria monocytogenes* during production and ripening of traditional Turkish Savak Tulum cheese and in synthetic gastric fluid." *Journal of Food Protection*, 76(10), 1801–1805. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-096>
- Abdullah, W., Elsayed, W. M., Abdelshafeek, K. A., Nazif, N. M., & Singab, A. N. B. (2016). "Chemical constituents and biological activities of *Cleome* genus: A brief review." *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(5), 777–787.
- Ahmad, N., Anwar, F., & Gilani, A. U. H. (2016). "Rose hip (*Rosa canina* L.) oils." In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 667–675). Elsevier.
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). "Listeriosis: A resurgent foodborne infection." *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02883.x>
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., López, M., Bernardo, A., & Hill, C. (2011). "*Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract." *Microbiology*, 157(12), 3268–3281. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051177-0>
- Amin, S. Q., Mahmood, H. J., & Zorab, H. K. (2023). "Campylobacteriosis." *One Health Triad*, 2, 87–93.
- Aanfill-Kuncewicz, H., Laniewska-Trokenheim, L., & Kuncewicz, A. (2009). "Survival of *Listeria monocytogenes* in Tvorog packaged with the use of different methods." *Milchwissenschaft*, 64, 64–67.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., ... & Kozaki, S. (2003). "An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk." *Epidemiology and Infection*, 130(1), 33. <https://doi.org/10.1017/S0950268802008188>
- Bairwa, R., Sodha, R. S., & Rajawat, B. S. (2012). "Trachyspermum ammi." *Pharmacognosy Review*, 6(11), 56–60. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95914>

Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). "Vibrio spp. infections." *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-7>

Banerjee, P., Singh, M., & Sharma, V. (2015). "Biofilm formation: A comprehensive review." *International Journal of Pharmaceutical Research & Health Sciences*, 3(4), 556–559.

Barber, M. A. (1914). "Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a cow." *Philippine Journal of Science*, 9, 515-519.

Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). "Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms." *Food Control*, 61, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.019>

Bhat, M. A. M. A., Ahmad, S., Aslam, J., Mujib, A., & Mahmooduzzfar. (2008). "Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum* L." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(1), 17–21. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.17>

Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., ... & Defez, R. (2006). "Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress." *Archives of Microbiology*, 185, 373-382. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0051-1>

Blackwood, B. P., & Hunter, C. J. (2016). "*Cronobacter* spp." *Microbiology Spectrum*, 4(2), 4-2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.0042-2016>

Blakeman, J. T., Morales-García, A. L., Mukherjee, J., Gori, K., Hayward, A. S., Lant, N. J., & Geoghegan, M. (2019). "Extracellular DNA provides structural integrity to a *Micrococcus luteus* biofilm." *Langmuir*, 35(19), 6468–6475. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01246>

Bone, F. J., Bogie, D., & Morgan-Jones, S. C. (1989). "Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese." *Epidemiology & Infection*, 103(3), 449-458. <https://doi.org/10.1017/S0950268800020048>

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). "Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drug." *Libyan Journal of Medicine*, 9(1), 25431. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>

Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). "Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 729–733. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.004>

Bouyahya, A., El Omari, N., Belmehdi, O., Lagrouh, F., El Jemli, M., Marmouzi, I., Faouzi, M. E. A., Taha, D., Bourais, I., Zengin, G., et al. (2021). "Pharmacological investigation of *Ajuga iva* essential oils collected at three phenological stages." *Flavour and Fragrance Journal*, 36, 75–83. <https://doi.org/10.1002/ffj.3476>

Brant, S. M. G. (2016). "Nutraceuticals in hepatic diseases." In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (pp. 87–99).

Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., & Benezech, T. (2016). "Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix." *FEMS Microbiology Letters*, 363(19), fnv229. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv229>

Brooks, J. L., & Jefferson, K. K. (2014). "Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*." *PLoS Pathogens*, 10(3), e1004292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004292>

Bruker. (2023). MBT Compass HT ve MBT Compass HT Endüstri Kullanıcısı Manuel, Doküman Numarası: 5034540.

Cai, Y., Wang, R., An, M.-M., & Bei-Bei, L. (2010). "Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and quorum sensing". *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 37–41. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100006>

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). "Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises". *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.016>

Centers for Disease Control and Prevention. (2012). "Multistate outbreak of listeriosis linked to imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese". Retrieved from <http://www.cdc.gov/listeria/> (Last accessed 6 November 2013).

Centers for Disease Control and Prevention. (2011). "Vital signs: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food—Foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996–2010". *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(22), 749–755. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6022a4>

Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). "Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains". *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00207-5)

Challan Belval, S., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2006). "Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2644–2650. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2644-2650.2006>

Chang, Y.-M., Jeng, W.-Y., Ko, T.-P., Yeh, Y.-J., Chen, C. K.-M., & Wang, A. H.-J. (2010). "Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 8617–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914719107>

Characklis, W. G. (1973). "Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes". *Water Research*, 7(9), 1249–1258. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90141-0)

Chauhan, N. B., & Mehla, J. (2015). "Ameliorative effects of nutraceuticals in neurological disorders". In *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease* (pp. 245–260). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-5.00027-0>

Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013). "Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm-related infections". *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18488–185.

Cheung, A. L., Nishina, K., & Manna, A. C. (2008). "SarA of *Staphylococcus aureus* binds to the sarA promoter to regulate gene expression". *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2239–2243. <https://doi.org/10.1128/JB.01823-07>

Cheung, G. Y., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S., & Otto, M. (2014). "Phenol-soluble modulins—Critical determinants of staphylococcal virulence". *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 698–719. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>

Chikhi, L., Mancier, M., Brugère, H., Lombard, B., Faouzi, L., Guillier, L., & Besse, N. G. (2024). "Comparison of *Listeria monocytogenes* alternative detection methods for food microbiology official controls in Europe". *International Journal of Food Microbiology*, 408, 110448.

Chin, H. S., Lee, J. H., & Hong, Y. S. (2021). "Rifampin resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*". *Journal of Clinical Microbiology*, 59(2), e01860-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01860-20>

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). "Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices". *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.

Chroho, M., Bouymajane, A., Oulad El Majdoub, Y., Cacciola, F., Mondello, L., Aazza, M., Zair, T., & Bouissane, L. (2022). "Phenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extract from Flowers of *Rosa damascena* from Morocco". *Separations*, 9(9), 247. <https://doi.org/10.3390/separations9090247>

Colagiorgi, A., di Ciccio, P., Zanardi, E., & Ghidini, S. (2016). "A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix". *Microorganisms*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010022>

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). "The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation". *Infection and Immunity*, 67(10), 5427–5433. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999>

Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2004). "Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*". *Infection and Immunity*, 72(4), 2177–2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>

Cummins, A. J., Fielding, A. K., & McLauchlin, J. (1994). "*Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS". *Journal of Infection*, 28(1), 89-91. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(05\)80018-5](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(05)80018-5)

Czaczyk, K., & Myszka, K. (2007). "Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation". *Polish Journal of Environment Studies*, 6(6), 799–806.

da Silva, E. P., & de Martinis, E. C. (2013). "Current knowledge and perspectives on biofilm formation: The case of *Listeria monocytogenes*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 957–968. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4557-5>

Damanhour, Z. A., & Ahmad, A. (2014). "A review on therapeutic potential of *Piper nigrum* L. (Black pepper): The king of spices". *Medicinal and Aromatic Plants*, 3, 161. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000161>

Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). "Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>

Dembek, Z. F., Smith, L. A., & Rusnak, J. M. (2007). "Botulism: Cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities". *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 1(2), 122-134. <https://doi.org/10>

Edewor, T. I., & Olajire, A. A. (2011). "The flavones from *Acanthospermum hispidum* DC and their antibacterial activity". *International Journal of Organic Chemistry*, 1, 132–141. <https://doi.org/10.4236/ijoc.2011.14018>

Egea, I., Sánchez-Bel, P., Romerojaro, F., & Pretel, M. T. (2010). "Replace synthetic additives in functional foods as a natural antioxidant". *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 121–129. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0192-7>

Eliasova, A., Repcak, M., & Pastirova, A. (2004). "Quantitative changes of secondary metabolites of *Matricaria chamomilla* by abiotic stress". *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(7-8), 543–548. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-0703>

El-Sawy, Y. N., Abdel-Salam, A. B., Abd-Elhady, H. M., Abou-Taleb, K. A., & Ahmed, R. F. (2024). "Elimination of detached *Listeria monocytogenes* from the biofilm on stainless steel surfaces during milk and cheese processing using natural plant extracts". *Scientific Reports*, 14(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-39336-6>

Ercisli, S. (2007). "Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species". *Food Chemistry*, 104(4), 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.021>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). Annual epidemiological report 2013: Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC. <https://doi.org/10.2900/24981>

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix". *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Foster, T. J. (2015). *Staphylococcus aureus*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 655–674). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00037-8>

Frederick, M. R., Kuttler, C., Hense, B. A., & Eberl, H. J. (2011). "A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities". *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 8, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-8-8>

Fretz, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, A. T., Stöger, A., Huhulescu, S., & et al. (2010). "Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009". *Eurosurveillance*, 15(45), 19477. <https://doi.org/10.2807/ese.15.45.19477-en>

Gaulin, C., Ramsay, D., & Bekal, S. (2008). "Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008". *Journal of Food Protection*, 75(1), 71–78. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-75.1.71>

Gaulin, C., Ramsay, D., Ringuette, L., & Ismail, J. (2003). "First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002". *Canadian Communicable Disease Report*, 29(6), 181–186. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v29i06a04>

Geiss, H. K., Piotrowski, H. D., & Hingst, V. (1985). "Evaluation of API 20 NE in routine diagnostics of nonfermenting gram-negative rod-shaped bacteria". *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene A*, 259(1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(85\)80005-5](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(85)80005-5)

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, N. R., & Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Ghosh, S., Turner, R. J., Bhagwat, T., & Webster, T. J. (2021). "Novel and Future Treatment Strategies for Biofilm-Associated Infections". In *Biofilm-mediated diseases: causes and controls* (pp. 239-276).

Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., & Holah, J. T. (1999). "Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms". *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 41–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00879.x>

- Gnanou, B. N., Brissonnet, F. D., Lafarge, V., & Leclerc, V. (2000). "Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*". *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 944–950. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01181.x>
- Gong, C., He, Y., Tang, Y., Hu, R., Lv, Y., Zhang, Q., ... & Chi, Y. (2021). "Biofilms in plant-based fermented foods: Formation mechanisms, benefits and drawbacks on quality and safety, and functionalization strategies". *Trends in Food Science & Technology*, 116, 940-953.
- Gorman, S. S., Imran, M., & Bakar, M. A. (2022). "The antibacterial effects of natural products in treating bacterial infections". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 1842. <https://doi.org/10.3390/ijms23071842>
- Gould, L. H., Mungai, E., & Behravesh, C. B. (2014). "Outbreaks attributed to cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998–2011". *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 545–551. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1682>
- Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., & de Valk, H. (2008). "Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries". *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 734–740. <https://doi.org/10.3201/eid1406.080047>
- Gram, H. C. (1884). "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". *Fortschritte der Medizin*, 2, 185–189.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). "Biofilm, pathogenesis and prevention—A journey to break the wall: A review". *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1266-3>
- Gülmez, D. (2014). "Antimikrobiyal direnci belirlemede fenotipik yöntemler veya klasik yöntemler". *Küresel Biyoloji Dergisi*, 28(Ek 2), 221–228.
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria". *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001>
- Huang, Y., Liu, H., & Zhao, J. (2020). "Nitrite and nitrate in processed meats and their health implications: A review". *Food Control*, 115, 107244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107244>
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). "Staphylococcus aureus biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602.
- Ieven, M., Verhoeven, J., Pattyn, S. R., & Goossens, H. (1995). "Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci". *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1060–1063. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1060-1063.1995>

Jablonski, L. M., & Bohach, G. A. (1997). "Staphylococcus aureus". In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 353–357). American Society for Microbiology Press.

Jefferson, K. K., Pier, D. B., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2004). "The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*". *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2449–2456. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2449-2456.2004>

Jenkins, S. A., Drucker, D. B., Keaney, M. G., & Ganguli, L. A. (1991). "Evaluation of the RAPID ID 32A system for the identification of *Bacteroides fragilis* and related organisms". *Journal of Applied Bacteriology*, 71(4), 360–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb03801.x>

Jensen, A., Frederiksen, W., & Gerner-Smidt, P. (1994). "Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989–1990". *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26(3), 171–178. <https://doi.org/10.3109/00365549409019954>

Jiang, X., Wu, X., & Zhang, C. (2021). "Antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* biofilms: A review on mechanisms and control strategies". *Food Control*, 119, 107451. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107451>

Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., & Stephan, R. (2015). "Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk". *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2944–2948. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9123>

Johnsen, B. O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E. H., & Nordøy, I. (2010). "A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital". *Journal of Infection*, 61(5), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.08.008>

Jones, M. G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A. B., & Collin, H. A. (2004). "Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic". *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1903–1918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh150>

Jordan, S. J., Perni, S., Glenn, S., & Fernandes, I. (2008). "*Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates". *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5451–5456. <https://doi.org/10.1128/AEM.01093-08>

Jordan, S. J., Peroni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., et al. (2008). "*Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates". *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5451–5456. <https://doi.org/10.1128/AEM.01093-08>

- Kang, J., Li, Q., Liu, L., Jin, W., Wang, J., & Sun, Y. (2018). "The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating *pgaABCD* genes expression". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8863-7>
- Khouchlaa, A., Talbaoui, A., El Idrissi, A. E. Y., Bouyahya, A., Ait Lahsen, S., Kahouadji, A., & Tijane, M. (2017). "Determination of phenol content and evaluation of in vitro litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract". *Phytothérapie*, 16, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytother.2017.01.004>
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., ... & et al. (2010). "Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany", 2006–2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12), 1581–1584. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0595>
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2017). "Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context". *LWT - Food Science and Technology*, 84, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.025>
- Kolwzan, B. (2011). "Analysis of biofilms: Their formation and functioning". *Ochrona Srodowiska*, 33(3), 3–14.
- Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A., & van de Beek, D. (2023). "Human listeriosis". *Clinical Microbiology Reviews*, 36(1), e00060-19.
- Koseoglu, V. K., Heiss, C., Azadi, P., & Topchiy, E. (2015). "Listeria monocytogenes exopolysaccharide: Origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation". *Molecular Microbiology*, 96(4), 728–743. <https://doi.org/10.1111/mmi.13055>
- Le, K. Y., & Otto, M. (2015). "Quorum-sensing regulation in staphylococci—An overview". *Frontiers in Microbiology*, 6, 1174. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
- Le, S., Bazger, W., Hill, A. R., & Wilcock, A. (2014). "Awareness and perceptions of food safety of artisan cheese makers in Southwestern Ontario: A qualitative study". *Food Control*, 41, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.004>
- Lemon, K. P., Freitag, N. E., & Kolter, R. (2010). "The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*". *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3969–3976. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-10>
- Li, J., Li, S., Li, H., Guo, X., Guo, D. U., Yang, Y., ... & Shi, C. (2021). "Antibiofilm activity of shikonin against *Listeria monocytogenes* and inhibition of key virulence factors". *Food Control*, 120, 107558. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107558>
- Li, W., Chen, J., & Zhang, X. (2020). "Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to clindamycin: A molecular approach". *Microorganisms*, 8(12), 1906. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121906>

Li, Y., Liu, Y., & Zhang, X. (2021). "Sulfites and their potential health risks in food: A review". *Food Science & Nutrition*, 9(4), 2041–2047. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2047>

Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2013). "Strain variability of the behavior of foodborne pathogens: A review". *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>

Linnan, M. J., Mascola, L., Xiao, D. L., Goulet, V., May, S., Salminen, C., & et al. (1988). "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese". *The New England Journal of Medicine*, 319(17), 823–828. <https://doi.org/10.1056/NEJM198810202191701>

Lister, J. L., & Horswill, A. R. (2014). "Staphylococcus aureus biofilms: Recent developments in biofilm dispersal". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>

Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., ... & et al. (2008). "Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK". *Food Microbiology*, 25(3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.006>

Luppens, S. B., Reij, M. W., van der Heijden, R. W., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). "Development of a standard test to assess the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants". *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4194–4200. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4194-4200.2002>

Makino, S.-I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., & et al. (2005). "An outbreak of foodborne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001". *International Journal of Food Microbiology*, 104(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.006>

Mangwani, N., Kumari, S., & Das, S. (2016). "Bacterial biofilms and quorum sensing: Fidelity in bioremediation technology". In S. Mayes & S. E. Harding (Eds.), *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Vol. 32, pp. 43–73). Taylor & Francis Ltd.

Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. (2009). "Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation". *PLoS ONE*, 4(4), e5822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822>

Manzoor, A., Yousuf, B., Pandith, J. A., & Ahmad, S. (2023). "Plant-derived active substances incorporated as antioxidant, antibacterial or antifungal components in coatings/films for food packaging applications". *Food Bioscience*, 53, 102717.

Marinelli, P., Pallares, I., Navarro, S., & Ventura, S. (2016). "Dissecting the contribution of Staphylococcus aureus α -phenol-soluble modulins to biofilm amyloid structure". *Scientific Reports*, 6, 34552. <https://doi.org/10.1038/srep34552>

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. (2017). "Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species". *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1137. <https://doi.org/10.3390/ijms18061137>

Martinez-Suarez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). "Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments". *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01256>

Masnavi, E., & Hassanzadeh, S. (2024). "Antibacterial activities of hydroalcoholic extract of *Rosa canina* L against hospital-acquired infections". *Journal of Clinical Care and Skills*, 5(3), 1001–1011.

Mason, J. B., Habicht, J. P., Tabatabai, H., & Valverde, V. (1984). "Nutritional surveillance" (p. 194pp).

Mehboob, H., Iqbal, M., Ejaz, M., Bibi, G., Sarwar, U., Iftikhar, S., et al. (2017). "A review on secondary metabolites of *Rosa laevigata* Michaux: An important medicinal plant". *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 6, 326. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000326>

Meloni, D. (2014). "Focusing on the main morphological and physiological characteristics of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*". *Journal of Veterinary Science and Research*, 1(1), in-press.

Meng, J., LeJeune, J. T., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2012). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli*". In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 287–309). ASM Press.

Miljković, V. M., Nikolić, L., Mrmošanin, J., Gajić, I., Mihajilov-Krstev, T., Zvezdanović, J., & Miljković, M. (2024). "Chemical profile and antioxidant and antimicrobial activity of *Rosa canina* L. dried fruit commercially available in Serbia". *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2518. <https://doi.org/10.3390/ijms25052518>

Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). "The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review". *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.003>

Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z., & Yousefian, S. (2011). "Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran". *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4584–4589.

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rezaei, S. (2022). "Effectiveness of amikacin in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infections". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(6), 1423–1429. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac079>

- Musayeib, N. M. A., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., & Ross, S. A. (2014). "New thiophene and flavonoid from *Tagetes minuta* leaves growing in Saudi Arabia". *Molecules*, 19(3), 2819–2828. <https://doi.org/10.3390/molecules19032819>
- Myszka, K., & Czaczyk, K. (2011). "Bacterial biofilm on food contact surfaces: A review". *Polish Journal of Food Nutrition Science*, 61(2), 173–180.
- Nassar, M. I., Aboutabl, E. S. A., Makled, Y. A., El-Khrisy, E. D. A., & Osman, A. F. (2010). "Secondary metabolites and pharmacology of *Foeniculum vulgare* Mill. Subsp. *Piperitum*". *Revista Latinoamericana de Química*, 38, 2.
- Nguyen, H. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). "The staphylococcal exopolysaccharide PIA—Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection". *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3324–3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.001>
- Nguyen, U. T., & Burrows, L. L. (2014). "DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms". *International Journal of Food Microbiology*, 18(2), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.018>
- Niculescu, A., Babotă, M., Zhang, L., Bunea, C. I., Gavrilăș, L., Vodnar, D. C., ... & Rocchetti, G. (2022). "Optimized ultrasound-assisted enzymatic extraction of phenolic compounds from *Rosa canina* L. pseudo-fruits (rosehip) and their biological activity". *Antioxidants*, 11(6), 1123. <https://doi.org/10.3390/antiox11061123>
- Nwafor, I. R., Alhassan, Y., Udoh, J. I., Odanibeh, D., Oyaniyi, J., Efoli-Bam, V. K., ... & Nwokafor, C. V. (2024). "Plant-derived bioactive compounds and their mechanistic roles in combating microbial biofilms". *Microbiology Research Journal International*, 34(9), 74–85.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J., & O'Gara, J. P. (2008). "A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB". *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3835–3850. <https://doi.org/10.1128/JB.01863-07>
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). "Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications". *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115–129. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115>
- Ostyn, A., De Buyser, M. L., Guillier, F., Groult, J., Felix, B., Salah, S., ... & Hennekinne, J. A. (2010). "First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009". *Eurosurveillance*, 15(13). <https://doi.org/10.2807/ese.15.13.19446-en>
- Otto, M. (2008). "Staphylococcal biofilms". In T. Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms* (Vol. 322, pp. 207–227). Springer.

Öz, M., Deniz, I., Okan, O. T., Baltacı, C., & Karatas, S. M. (2021). "Determination of the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of different parts of *Rosa canina* L. and *Rosa pimpinellifolia* L. essential oils". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(3), 519-537.

Öz, M., Deniz, İ., Okan, O. T., Baltacı, C., & Karataş, S. M. (2021). "Determination of the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of different parts of *Rosa canina* L. and *Rosa pimpinellifolia* L. essential oils". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1936204>

Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. J. A. M. (2020). "Prevention of biofilm formation by quorum quenching". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10467-2>

Pan, Y., Breidt Jr., F., & Kathariou, S. (2006). "Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment". *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711–7717. <https://doi.org/10.1128/AEM.00748-06>

Pederson, D. B., Dong, Y., Blue, L. B., Smith, S. V., & Cao, M. (2018). "Water-soluble cranberry extract inhibits *Vibrio cholerae* biofilm formation possibly through modulating the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylate level". *PLOS ONE*, 13(11), e0207056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207056>

Peña, F., Valencia, S., Tereucán, G., Nahuelcura, J., Jiménez-Aspee, F., Cornejo, P., & Ruiz, A. (2023). "Bioactive compounds and antioxidant activity in the fruit of rosehip (*Rosa canina* L. and *Rosa rubiginosa* L.)". *Molecules*, 28(8), 3544. <https://doi.org/10.3390/molecules28083544>

Pereira, M. L., Do Carmo, L. S., Dos Santos, E. J., Pereira, J. L., & Bergdoll, M. S. (1996). "Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning". *Journal of Food Protection*, 59(5), 559-561. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.5.559>

Petrova, O. E., Gupta, K., Liao, J., Goodwine, J. S., & Sauer, K. (2017). "Divide and conquer: The *Pseudomonas aeruginosa* two-component hybrid SagS enables biofilm formation and recalcitrance of biofilm cells to antimicrobial agents via distinct regulatory circuits". *Environmental Microbiology*, 19(5), 2005–2024. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13749>

Phan-Thanh, L., Mahouin, F., & Aligé, S. (2000). "Acid responses of *Listeria monocytogenes*". *International Journal of Food Microbiology*, 55(2-3), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00207-6)

Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E., & Ferreira, M. A. S. S. (2005). "Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese". *Food Microbiology*, 22(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.004>

Prakash, P., & Gupta, N. (2005). "Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: A short review". *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49(2), 125–131.

Public Health England. (2014). "Preparation of samples and dilutions, plating and sub-culture". Microbiology Services. Food, Water & Environmental Microbiology Standard Method FNES26 (F2); Version 1.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. (2015). "Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents." *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>

Rahi, P., Prakash, O., & Shouche, Y. S. (2016). "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: Challenges and scopes for microbial ecologists." *Frontiers in Microbiology*, 7, 1359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>

Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). "Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157: H7 in food and water." *International Journal of Food Microbiology*, 349, 109233.

Ravula, R. R., & Shah, N. P. (1998). "Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks." *Biotechnology Techniques*, 12, 819–822. <https://doi.org/10.1023/A:1008839312135>

Rawson, A. M., Dempster, A. W., Humphreys, C. M., & Minton, N. P. (2023). "Pathogenicity and virulence of *Clostridium botulinum*." *Virulence*, 14(1), 2205251.

Renier, S., Chagnot, C., Deschamps, J., Caccia, N., Szlavik, J., Joyce, S. A., et al. (2014). "Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture, and induces biofilm formation in environmental conditions." *Environmental Microbiology*, 16(6), 1176–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12351>

Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2007). "Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in adherence and differential expression pattern." *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6125–6133. <https://doi.org/10.1128/AEM.00679-07>

Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., & Bille, J. J. S. M. W. (1986). "Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult." *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 116(8), 248-251.

Romeiro, P. F. R., Coelho, A. S., de Almeida, J. M., Alonso, V. P. P., Prata, A. S., Crippa, B. L., & Silva, N. C. C. (2024). "Unraveling the antimicrobial activity of nutmeg and turmeric essential oils against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp." *Food Science and Technology*, 44, Article 104294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114294>

Rovná, K., Ivanišová, E., Žiarovská, J., Ferus, P., Terentjeva, M., Kowalczewski, P. Ľ., & Kačániová, M. (2020). "Characterization of Rosa canina fruits collected in urban areas of Slovakia: Genome size, iPBS profiles and antioxidant and antimicrobial activities." *Molecules*, 25(8), 1888. <https://doi.org/10.3390/molecules25081888>

Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). "Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>

Sabat, A., Melles, D. C., Martirosian, G., Grundmann, H., van Belkum, A., & Hryniewicz, W. (2006). "Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains." *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1135–1138. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1135-1138.2006>

Salehi, B., Quispe, C., Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., Sharifi-Rad, J., Bouyahya, A., Akram, M., Iqbal, M., Docea, A. O., et al. (2021). "Pharmacological properties of chalcones: A review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence." *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2068. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.606880>

Salina, A., Guimarães, F. F., Pereira, V. R., Menozzi, B. D., Rall, V. L. M., & Langoni, H. (2020). "Detection of icaA, icaD, and bap genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastitis." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(03), 1034-1038.

Santativongchai, P., Tulayakul, P., & Jeon, B. (2023). "Enhancement of the antibiofilm activity of nisin against *Listeria monocytogenes* using food plant extracts." *Pathogens*, 12(3), 444. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030444>

Sarem, M., Ali, K., & Teymouri, F. (2020). "Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* in biofilm: A comprehensive review." *Current Microbiology*, 77(12), 3147-3157. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02193-2>

Sasidharan, I., Venugopal, V. V., & Menon, A. N. (2012). "Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivars from Sikkim." *Natural Product Research*, 26(19), 1759–1764. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.603111>

Schlech, W. F. (1988). "Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*." *Food Technology*, 42(4), 176-178.

Schoder, D., Rossmanith, P., Glazer, K., & Wagner, M. (2012). "Fluctuation in contamination dynamics of *L. monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010." *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.017>

Schoder, D., Skandamis, P., & Wagner, M. (2013). "Assessing in-house monitoring efficiency by tracing contamination rates in cheese lots recalled during an outbreak of listeriosis in Austria." *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.007>

Selvaraj, A., Jayasree, T., Valliammai, A., & Pandian, S. K. (2019). "Myrtenol attenuates MRSA biofilm and virulence by suppressing sarA expression dynamism." *Frontiers in Microbiology*, 10, 2027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02027>

Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R., & Mallubhotla, S. (2015). "Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors." *Natural Product Research*, 29(8), 745–749. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.981860>

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, M., & Nagarajan, A. (2016). "Hydrophobicity of foodborne pathogens and biofilm formation on common food contact surfaces." *Food Research International*, 89, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.037>

Sharma, P., & Agarwal, S. (2018). "Isolation, characterization, and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products." *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2428–2436. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13648>

Tatini, S. R. (1973). "Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins." *Journal of Food Protection*, 36(11), 559–563. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-36.11.559>

Taylor, C. M., Beresford, M., Eptom, H. A. S., Sigeel, D. C., Shama, G., Andrew, P. W., et al. (2002). "*Listeria monocytogenes* relA and hpt mutants are impaired in surface-attached growth and virulence." *Journal of Bacteriology*, 184(3), 621–628. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.621-628.2002>

Teshika, J. D., Zakariyyah, A. M., Zaynab, T., Zengin, G., Rengasamy, K. R. R., Pandian, S. K., et al. (2018). "Traditional modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1449074>

Todd, E., Szabo, R., Gardiner, M. A., Aktar, M., Delorme, L., Tourillon, P., ... & Breton, J. P. (1981). "Intoxication staphylococcique liée à du caillé de fromagerie – Québec." *Rapp Hebdomadaire Maladie Canadienne*, 7, 171–172.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). "Environmental factors that shape biofilm formation." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>

Tremoulet, F., Duche, O., Namane, A., & Martinie, B. (2002). "Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis." *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00080-1)

Trentin, D. S., Silva, D. B., Frasson, A. P., Rzhapishevska, O., da Silva, M. V., de L. Pulcini, E., ... & Macedo, A. J. (2015). "Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria." *Scientific Reports*, 5(1), 8287. <https://doi.org/10.1038/srep08287>

Tresse, O., Lebre, V., Benezech, T., & Faille, C. (2006). "Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7." *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 53–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02843.x>

Türk Standartları Enstitüsü. (2017). "Gıda zinciri mikrobiyolojisi, *Listeria monocytogenes* ve *Listeria spp.*'nin tespiti ve sayımı için yatay yöntem, Bölüm 1." TS EN ISO 11290-1.

Türk Standartları Enstitüsü. (2017). "Gıda zinciri mikrobiyolojisi, *Listeria monocytogenes* ve *Listeria spp.*'nin tespiti ve sayımı için yatay yöntem, Bölüm 2." TS EN ISO 11290-2.

Türk Standartları Enstitüsü. (2021). "Gıda zinciri mikrobiyolojisi, koagülaz pozitif stafilokokların (*Staphylococcus aureus* ve diğer türler) sayımı için yatay yöntem, Bölüm 1: Baird-Parker agar besiyeri kullanan yöntem." TS EN ISO 6688-1.

Vaillant, V., Maillot, D. E., Charley, C., & Stainer, F. (1998). "Épidémie de listeriose, France, avril-août 1995." Saint-Maurice, France: Institut de Veille Sanitaire.

Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2003). "SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*." *Molecular Microbiology*, 48(4), 1075–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03451.x>

Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). "Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid." *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004>

Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). "Biofilm formation and the food industry: A focus on the bacterial outer surface." *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x>

Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Waites, W. M. (2000). "Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel." *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 860–863. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.860-863.2000>

Ventola, C. L. (2021). "The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new antimicrobial agents." *Pharmacy and Therapeutics*, 46(7), 402–411. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8525585/>

Wang, D. H., Du, F., Liu, H. Y., & Liang, Z. S. (2010). "Drought stress increases iridoid glycosides biosynthesis in the roots of *Scrophularia ningpoensis* seedlings." *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2691–2699.

Wang, L., Zhang, X., & Liu, Q. (2022). "The effects of BHA and BHT on human health: A comprehensive review." *Toxicology Reports*, 9, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.007>

Weathers, P. J., & Towler, M. J. (2012). "The flavonoids casticin and artemetin are poorly extracted and are unstable in an *Artemisia annua* tea infusion." *Planta Medica*, 78(10), 1024–1026. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281641>

Wemmenhove, E., Stampelou, I., van Hooijdonk, A. C. M., Zwietering, M. H., & Wells-Bennik, M. H. (2013). "Fate of *Listeria monocytogenes* in Gouda microcheese: No growth, and substantial inactivation after extended ripening times." *International Dairy Journal*, 32(2), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.004>

Wenzig, E. M., Widowitz, U., Kunert, O., Chrubasik, S., Bucar, F., Knauder, E., & Bauer, R. (2008). "Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations." *Phytomedicine*, 15, 826–835. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.012>

Wing, E. J., & Gregory, S. H. (2000). "An updated model of cell-mediated immunity-listeriosis: Clinical and research aspects." In *Allergy and Asthma Proceedings*, 21(4), 209. OceanSide Publications.

Winkelstroter, L. K., & Martinis, E. C. P. D. (2015). "Different methods to quantify *Listeria monocytogenes* biofilm cells showed different profiles in their viability." *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 231–235. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822015000100024>

Wolz, C., Goerke, C., Landmann, R., Zimmerli, W., & Fluckiger, U. (2002). "Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection." *Infection and Immunity*, 70(5), 2758–2762. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2758-2762.2002>

World Health Organization. (2015). "WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015." In *Encyclopedia of Parasitology* (pp. 3884–1). https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884

World Health Organization. (2023). "Antimicrobial resistance: Global report on surveillance." World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240063601>

Yuan, Q., Zhang, J., & Zhang, Y. (2021). "Antibacterial and antiviral properties of garlic: A review." *Microorganisms*, 9(4), 832. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040832>

Zazharskyi, V. V., Davydenko, P., Kulishenko, O., Borovik, I. V., & Brygadyrenko, V. V. (2019). "Antimicrobial activity of 50 plant extracts." *Biosystems Diversity*, 27(2), 163-169. <https://doi.org/10.15421/011919>

Zhao, B. T., Kim, T. I., Kim, Y. H., Kang, J. S., Min, B. S., Son, J. K., et al. (2018). "A comparative study of *Mentha arvensis* L. and *Mentha haplocalyx* Briq. by HPLC." *Natural Product Research*, 32(2), 239–242. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1321749>

Zhao, L., Zhang, Q., & Li, L. (2021). "Effectiveness of vancomycin in treating *Staphylococcus aureus* biofilm infections: Challenges and alternatives." *Clinical Microbiology and Infection*, 27(5), 650-656. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.021>

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. (2017). "Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives." *RSC Advances*, 7, 36670–36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>

Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., & Pan, J. (2020). "Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation." *Frontiers in Microbiology*, 11, 589640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>

Živković, J., Stojković, D., Petrović, J., Zdunić, G., Glamočlija, J., & Soković, M. (2015). "*Rosa canina* L.–new possibilities for an old medicinal herb." *Food & Function*, 6(12), 3687-3692. <https://doi.org/10.1039/C5FO00790G>

Živković, J., Stojković, D., Petrović, J., Zdunić, G., Glamočlija, J., & Soković, M. (2015). "*Rosa canina* L.–new possibilities for an old medicinal herb." *Food & function*, 6(12), 3687-3692.

Zong, Z., Li, X., & Li, Y. (2021). "Efficacy of ciprofloxacin in treating *Staphylococcus aureus* biofilm infections: A review." *Antibiotics*, 10(8), 1005. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081005>

ÖZGEÇMİŞ

Selen KAYA, 2016 yılında başladığı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2021 yılında başarıyla tamamladı. 2022 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı.

