

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**2021-YL-008**

**AYDIN İLİNDE SATIŞ TEZGAHLARINDA**  
**TÜKETİME SUNULAN GIDALARDA BİYOFİLM**  
**OLUŞTURAN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Mediha ONUR**

**Tez Danışmanı:**  
**Doç. Dr. Esin POYRAZOĞLU**

**AYDIN**



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mediha ONUR tarafından hazırlanan Aydın İlinde Satış Tezgahlarında Tüketime Sunulan Gıdalarda Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Araştırılması başlıklı tez, 11/01/2021 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Doç.Dr. Esin POYRAZOĞLU	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr.H. Halil BIYIK	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. Mustafa ATEŞ	EGE ÜNİV.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygunatıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../2021

Mediha ONUR



## ÖZET

### AYDIN İLİNDE SATIŞ TEZGAHLARINDA TÜKETİME SUNULAN GIDALARDA BİYOFİLM OLUŞTURAN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI

Mediha ONUR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esin POYRAZOĞLU  
2021, 67 sayfa

Beslenme tüm canlılarda olduğu gibi insanlar için de çok önemli bir unsurdur. Beslenmede kullanılan gıdalar metabolik aktiviteleri sağlar ve enerji oluşturur. Bazı durumlarda gıdalarda oluşan mikrobiyal gelişim, insanlar üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Gıdalar üzerinde özellikle biyofilm oluşturan bakterilerin gelişimi, sağlık açısından tehlike yaratabilmektedir. Bu nedenle gıdaların üretiminden tüketimine kadar her aşamada gıda hijyeni ve güvenliği önemlidir. Çalışmada toplam 80 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan 67 adet bakteri tanılaması yapılmıştır. Kalitatif analiz sonucunda 9 bakterinin biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Kantitatif analizde *Enterococcus faecalis strain 2623*, *Bacillus cereus strain PJA1.5*, *Citrobacter freundii strain E2WCTM1*, *Staphylococcus epidermidis strain 3039*, *Bacillus cereus strain TBMAX51*, *Pantoea conspicua strain B6*, *Enterococcus faecium strain 4525* bakterileri kuvvetli adrehan iken *Enterococcus gallinarum strain CCFM8325* ve *Enterococcus faecium strain CAU1957* adrehan özellik göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, Gıda, Gıda Tezgâhları, Bakteri, Kalitatif ve Kantitatif Analiz





## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF BIOFILM-FORMING BACTERIA IN FOOD SUPPLIED FOR CONSUMPTION ON SALES STALLS IN AYDIN PROVINCE

Mediha ONUR

Master's Thesis, Department of Biology

Supervisor: Doç.Dr. Esin POYRAZOĞLU

2021, 67 pages

Nutrition is a very important element for humans as in all living things. Foods used in nutrition provide metabolic activities and create energy. In some cases, microbial growth in foods can have adverse effects on humans. Especially the growth of biofilm-forming bacteria on foods can pose a health hazard. For this reason, food hygiene and safety is important at every stage from the production to consumption of food.. A total of 80 bacteria isolates were obtained in the study. 67 bacteria identification was made from these isolates. As a result of qualitative analysis, it was determined that 9 bacteria formed biofilms. In quantitative analysis, *Enterococcus faecalis* strain 2623, *Bacillus cereus* strain PJA1.5, *Citrobacter freundii* strain E2WCTM1, *Staphylococcus epidermidis* strain 3039, *Bacillus cereus* strain TBMAX51, *Pantoea conspicua* strain B6 and *Enterococcus faecium* strain 4525 bacteria were strong adrehan, while *Enterococcus gallinarum* strain CCFM8325 and *Enterococcus faecium* strain CAU1957 showed adrehan characteristics.

**Key Words:** Biofilm, Food, Food Stalls, Bacteria, Qualitative and Quantitative Analysis



## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim sırasında tanıştığım, ilk günden bugüne bilgi birikimi, akademik donanımı, ilgisi, emeği, sabrı ve her zaman desteği ile yanımda olan danışman hocam Doç.Dr. Esin POYRAZOĞLU'na teşekkür ederim.

Sadece bilimsel alanda değil fikirleri ile de yoluma ışık gösteren desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Prof.Dr. H.Halil BIYIK'a, tez çalışmam sırasında ve tez yazım aşamasında her zaman desteğini gördüğüm Dr. Bahadır TÖRÜN'e teşekkür ederim.

Yorulduğum, zorlandığım zamanlarda manevi destekleri ile güç veren bana inanarak yoluma devam etmemi sağlayan, kızları olduğum için gurur duyduğum annem, babam ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Manevi olarak beni destekleyen arkadaşlarıma özellikle üniversite arkadaşlarım Senem ÖZTÜRK KÖSE ve Kerem TEKİN'e her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Tez çalışması için FEF-19003 No'lu proje gerekli maddi desteği sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Mediha ONUR



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Biyofilmin Tarihçesi .....	4
1.2. Biyofilmin Tanım ve Yapısı.....	5
1.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Aşamaları .....	7
1.3.1. Tutunma .....	8
1.3.2. Geri Dönüşümsüz Bağlanma.....	9
1.3.3. Kolonizasyon ve Mikrokoloni Oluşumu .....	9
1.3.4. Kopma.....	10
1.4. Quorum Sensing (Yeterli Yoğunluğu Algılama).....	10
1.4.1. Gram Negatif Bakterilerde Quorum Sensing Mekanizması (Yoğunluğu Algılama) .....	11
1.4.2. Gram Pozitif Bakterilerde Quorum Sensing Mekanizması (Yoğunluğu Algılama) .....	12
1.5. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen İç ve Dış Faktörler .....	13
1.6. Biyofilmde Antimikrobiyal Direnç Mekanizması.....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	16
2.1. Dünya'da Yapılan Çalışmalar.....	16

2.2. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar .....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	21
3.1. Örneklerin Toplanması ve İzolatların Saflaştırılması.....	21
3.1.1. Örneklerin Toplanması.....	21
3.1.2. İzolatların Saflaştırılması.....	21
3.1.3. Kullanılan Besi Ortamları.....	22
3.1.4. Çözeltiler .....	23
3.2. İzolatların İdentifikasyonu.....	28
3.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikler .....	28
3.2.2. İzolatların Kültürel Özellikler .....	29
3.2.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikler .....	29
3.2.3.1. Katalaz Testi.....	29
3.2.3.2. Karbonhidrat Fermantasyon .....	29
3.2.3.3. Nişasta Hidrolizi .....	30
3.2.3.4. Üre Hidrolizi.....	30
3.2.3.5. Hidrojen Sülfid Üretimi.....	30
3.2.3.6. İndol Testi.....	30
3.2.3.7. Metil Red Testi .....	30
3.2.3.8. Voges Proskauer Testi.....	30
3.2.3.9. Sitrat Testi .....	31
3.2.4. Moleküler Analiz.....	31
3.2.4.1. Total DNA İzolasyonu .....	31
3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	32
3.3. Biyofilm Analizi.....	34
3.3.1. Kalitatif Analiz .....	34
3.3.2. Kantitatif Analiz .....	34

4. BULGULAR .....	35
4.1. İzolatların Morfolojileri.....	35
4.2. Kültürel Özellikler.....	36
4.3. Biyokimyasal Analiz .....	36
4.3.1. Analiz Sonuçları.....	36
4.4. Moleküler Analiz .....	37
4.4.1. Moleküler Analiz Sonuçları .....	37
4.4.2. Analizi Yapılan Modeller ve Filogenetik Ağaç Diyagramı .....	43
4.5. Biyofilm Analizi.....	45
4.5.1. Kalitatif Analiz.....	45
4.5.2. Kantitatif Analiz.....	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	67





**SİMGELERve KISALTMALAR DİZİNİ**

µm	: Mikrolitre
cm <sup>2</sup>	: Santimetrekare
Gr (-)	: Gram Negatif
Gr (+)	: Gram Pozitif
GTR+G+I	: General Time Reversible
AI	: Otoindükleyici
AI2	: Otoindükleyici 2
KI	: Potasyum İyodür
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
M	: Molar
mL	: Mililitre
SDS	: Sodyum Dodesilsülfat
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
ark	: Arkadaşları
BRA	: Brain Heart Agar
CRA	: Congo Red Agar
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
MP	: Mikroplak
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

xviii

sdH<sub>2</sub>O : Steril Distile Su

vb : Ve benzeri

MR : Metil KırmızıSı

VP : Voges Proskauer



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anton van Leeuwenhoek'un basit mikroskobu.....	5
Şekil 1.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü.....	6
Şekil 1.3. Biyofilm oluşum aşamaları .....	8
Şekil 1.4. Quorum sensing mekanizması .....	11
Şekil 1.5.a. Gram negatif bakterilerde LuxI-LuxR sistemi .....	12
Şekil 1.5.b. Gram pozitif bakterilerdeki quorum sensing mekanizması.....	13
Şekil 3.1. Açık pazar yerinde örnek alınan peynir tezgahı (Aydın).....	21
Şekil 3.2. Gram boyama aşamaları.....	29
Şekil 4.1. <i>Bacillus cereus</i> 'un Gram boyama sonucunun mikroskopta incelenmesi .....	35
Şekil 4.2. TSA besi ortamında gelişen saf bakteri kültürü .....	36
Şekil 4.3. İzole edilen bakteri DNA'larının jel elektroforezinde görüntülenmesi (M:1kb DNA marker. Genmark) .....	37
Şekil 4.4. Maximum likelihood yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaç .....	44
Şekil 4.5. Biyofilm oluşumunun kalitatif yönden negatif sonuç örneği.....	45
Şekil 4.6. Biyofilm oluşumunun kalitatif yönden pozitif sonuç örneği .....	46
Şekil 4.7. Biyofilm oluşumunun kantitatif yönden değerlendirilmesinde kullanılan 96 kuyucuklu Elisa-Plate .....	46



## ÇİZELGELER DİZİNİ (

Çizelge 1.1. Biyofilm içeriği (%) .....	6
Çizelge 3.1. TSB besiortamı bileşenleri.....	22
Çizelge 3.2. TSA besiortamı bileşenleri.....	22
Çizelge 3.3. Kongo Red besiortamı bileşenleri.....	23
Çizelge 3.4. %20'lik Skim milk .....	23
Çizelge 3.5. Kristal Violet boyası .....	24
Çizelge 3.6. İyot solüsyonu.....	24
Çizelge 3.7. Safranin çözeltisi.....	24
Çizelge 3.8. Proteinaz K.....	25
Çizelge 3.9. %20 SDS .....	25
Çizelge 3.10. RNase solüsyonu.....	25
Çizelge 3.11. Lizozim solüsyonu çözeltisi.....	26
Çizelge 3.12. Agaroz jel çözeltisi.....	26
Çizelge 3.13. Sodyum asetat çözeltisi.....	26
Çizelge 3.14. TBE tamponu .....	27
Çizelge 3.15. Etanol solüsyonu .....	27
Çizelge 3.16. Kovaks solüsyonu .....	27
Çizelge 3.17. $\alpha$ -Naftol solüsyonu.....	28
Çizelge 3.18. Gram boyama işlemi .....	28
Çizelge 3.19. PCR bileşenleri .....	33
Çizelge 3.20. PCR şartları .....	33
Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları. ....	38
Çizelge 4.2. Test edilen model ve skor sonuçları.....	43
Çizelge 4.3. Spektrofotometre ölçüm sonuçları .....	47



## 1. GİRİŞ

İnsanların vücut aktiviteleri ve metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için enerjiye ihtiyaçları vardır. Bu enerjiyi de tükettikleri gıdalardan sağlamaktadırlar. Bazı durumlarda insanların metabolik aktiviteleri için vücuda aldıkları gıdalar, insanlar üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Bu olumsuz etkileri önlemek için gıdalar, gıdaların işlenmesi, gıdaların satışı ve gıdaların tüketimi ile ilgili bir takım gerekli önlemlerin alınması zorunluluktur. Bu önlemlerin tamamına “Gıda Güvenliği” denir (Demirağ ve Yılmaz, 2009; Artık ve ark., 2019).

Bir gıdanın güvenli gıda olabilmesi için üretimden tüketime kadar her aşamada sağlık ve hijyen kurallarına uyulması gerekir. Hijyenik koşullarda üretilen hijyenik gıdalar sağlıklı beslenmenin anahtarıdır. Sağlıklı bir beslenme için, gıdanın üretimden tüketime kadar olan her aşamasında gıda güvenliği sürecini bir bütün olarak düşünmek gerekmektedir (Yaralı, 2018).

Gıda güvenliğinin sağlanmasında tarım ilaçları gibi kimyasal kontaminantlarla birlikte mikroorganizmaların kendileri veya toksinlerinin kontrolü önemlidir. Gıda güvenliği küresel bir halk sağlığı sorunudur. Ev dışında ve kötü hijyen koşullarında üretilen gıda tüketiminin artmasıyla gıda güvenliği riski de artmaktadır (Madenci ve ark., 2019).

Gıda güvenliğine ve güvenilir gıdaya erişimi sağlamak WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) ’nun ortak amaçları arasında yer almaktadır. Gıda, hazırlandığında ya da yendiğinde tüketiciye zarar vermesinin önlenmesi olarak tanımlanan CAC (Kodeks Alimentarius Komisyonu) bu iki organizasyon tarafından kurulmuştur (Anonim, 1997).

Dünyada, gıda güvenliğini sağlamak için HACCP ve ISO 22000 “Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi” bulunmaktadır. HACCP “Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları Sistemi”, gıda zincirinde hammadde tedarikinden başlayarak, gıda hazırlama, işleme, üretim, paketlenme gibi gıda zincirinin her aşamasında kritik kontrol noktalarını belirler. Bu sistem, gıda ile ilgili farklı büyüklükteki her kuruluşa uygulanabilen, her aşamasında ortaya çıkabilecek sorunlara çözüm getiren ve belirli normlara uygun güvenilir bir sistemidir.

ISO 22000 Standardı ise tüketicinin gıda kaynaklı hastalıklara maruz kalmasını önlemek ve altyapı, personel ve ekipman gibi tüm etkileriyle birlikte gıda zincirindeki tüm süreçleri kontrol etmek için geliştirilmiş önleyici bir sistemdir (Panghal ve ark., 2018). Organizasyonlardaki Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi uygulamaları; üretim kontrolü, ürün kontrolü, ekipman kontrolü, bakım ve genel hijyen uygulamaları, personel ve ziyaretçi hijyeni, taşıma, depolama, ürün bilgisi, eğitim, tedarikçi seçimi ve değerlendirmesi konularını kapsar (Başaran, 2016).

Türkiye'de gıda güvenliği ile ilgili ilk yasa 1952 yılında kabul edilmiştir. Türk Gıda Kodeksi (2020) ile Gıda Üretimi, Tüketimi ve Denetimi Yönetmeliği (1998), Türkiye'nin gıda güvenliği alanında yasal altyapı oluşturma çabalarının ürünüdür. Ancak, Türkiye bu konuda yapılan uluslararası çabaların gerisinde kalmaktadır. Örneğin Türkiye, ABD'nin 2002'de 1972'den beri uyguladığı HACCP sistemini uygulamıştır. 2010'larla birlikte Gıda Hijyeni Yönetmeliği (2011) ve Gıda İşletmelerinin Kayıt ve Onay Prosedürleri (2011) yürürlüğe girmiştir (Başaran, 2016).

Görüldüğü gibi, gıda güvenliğini sağlamak için ulusal ve uluslararası düzeyde çaba sarf edilmektedir. Ancak, gıda güvenliği konusu tek taraflı bir konu değildir. İşletmeler ve hükümetler gıda güvenliğinden sorumludur. Bu nedenle, devlet kurumları ve özel kuruluşlar potansiyel tehlikeleri tanımlamak ve riski analiz etmek ve dünya çapında gıda kaynaklı salgınları kontrol etmek için birlikte hareket etmelidir. Bu nedenle, gıda güvenliği sadece bir tarafın sorumluluğuna bırakılmayan ciddi bir konudur.

Gıda güvenliği; tüketici sağlığının korunması, gıda endüstrisi ve ekonomi açısından büyük öneme sahiptir (Fuerst,1983). İnsanların yeterli ve dengeli beslenmelerine ilaveten tükettikleri gıdaların hijyenik kalitelerinin de iyi olması şarttır. Yetersiz hijyen bilgisi ve uygulamaları gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Bu durum hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerin başlıca problemlerinden biridir (Abdalla ve ark., 2008, Noronha,2006).

Gıda güvenliğinde ilk aşama olan hijyen, ortamın sağlıklı olması için yapılan uygulamalar ve alınan temizlik önlemleridir. Ayrıca bu bilim dalı halk sağlığının korunmasında ve iyileştirilmesinde beslenme, sağlık ve çevre konularını da kapsar (Kayaardı, 2005).



Gıda hijyeni; sağlıklı ve kusursuz gıda elde etmek için, gıdaların üretim, işleme, koruma ve dağıtım aşamalarında uyulması gereken kurallar ve alınması gereken önlemler bütünüdür (Demirdağ ve Yılmaz, 2009). Gıdalardaki mikrobiyolojik (bakteri, virüs, küf, mantar, parazit gibi) ; kimyasal (ağır metaller, gıda katkı maddeleri, tarım/veteriner ilaçları gibi) ve fiziksel (kir, cam, metal, taş vb.) etkenler sağlık noktasında önemli risk faktörleridir (Özkaya ve Cömert, 2008; Urazel ve ark., 2014).

Gıda kaynaklı hastalıklar canlılarda zehirlenme, yaralanma hatta ölüme yol açabilecek kadar tehlikelidir. Tüketiciyi koruyabilmek için gıda satın alma, hazırlama, pişirme ve muhafaza süreçlerinde iyi hijyen uygulamalarına dikkat edilmelidir (Losasso ve ark., 2012).

Gıdalar; üretim, hazırlık, paketlenme ve satış gibi aşamalarda gıdalla temas halinde olan personel ve kullanılan alet-ekipman tarafından kontamine olabilmektedir (Tayar ve Yıbar, 2013).

Bu kontaminasyon sebeplerinden biri olan personel kaynaklı patojen bulaşmasının kontamine olmuş kumaş, yüzük, para, deri yüzeyleri, toz ve kişiden kişiye bulaşma şeklinde gerçekleşebilir. Patojenler, kontamine olmuş gıda çalışanları ve gıda temas yüzeylerinde bulaşma oluncaya kadar canlılığını korumaktadır (Todd ve ark., 2007). Yüzeylerin kuru olması bakteri gelişimi ve canlılığını azaltır fakat bakterileri sporları bu koşullara dayanabilmektedir (Kusumaningrum ve ark., 2003). Gıda temas yüzeylerinin mikrobiyal yükü özellikle tüketime hazır gıdaların sunuma hazırlanması, dilimlenmesi, kesilmesi aşamalarında daha fazla önem arz etmektedir. Bu ekipmanlardan dilimleme makineleri ve kesme ekipmanlarının gerek fabrikalarda gerekse de satış noktalarında gıdaların kontaminasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Perez-Rodriguez ve ark., 2010).

Cansız yüzeylere mikrobiyal yapışma ve biyofilm oluşumu, gıda ve sağlık gibi birçok sektördeki ekonomik ve halk sağlığı açısından ciddi konular olarak kabul edilir. Gıda üretim ve satış sektöründe patojenik mikroorganizmaların varlığı, tüketiciler için potansiyel sağlık riski oluşturmaktadır (Abdallah ve ark., 2014). Kontamine gıda ile temas eden yüzeyler, bakterilerin kendilerine tutunmasına ve daha sonra gıda ürünlerinin çapraz kontaminasyon sonucu biyofilm kaynağı haline gelmesi için olanak sağlar (Hood ve Zottola, 1995).

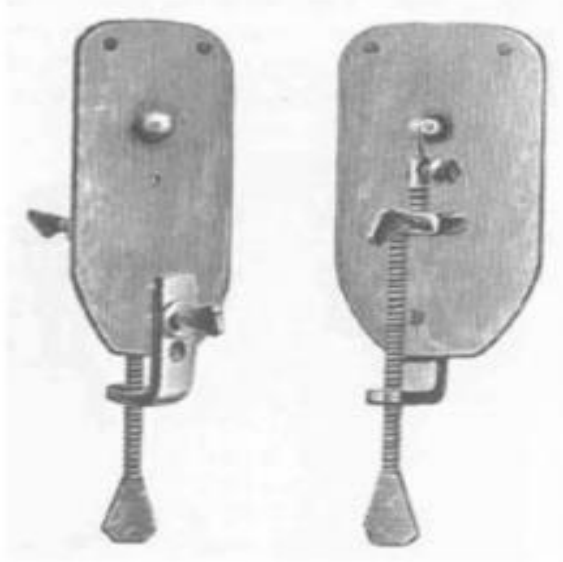
Biyofilmler, bir yüzeye yapışan ve koruyucu bir hücre dışı matrikse gömülmüş birden fazla türden oluşan karmaşık mikrobiyal ekosistemler olarak tanımlanır (Khelissa ve ark., 2017). Hücrelerin eklenmesi ve devamında biyofilm oluşumu yüzey materyali, pürüzlülük ve hidrofobiklikten etkilenebilir (Simões ve ark., 2010).

Bu çalışmanın amacı, Aydın ilinde açıkta satılan çeşitli gıdalardan ve satış tezgahlarından alınan örneklerde gelişen bakterilerin izolasyonu, tanılanması ve biyofilm oluşumlarının araştırılmasıdır. Biyofilm oluşumları kalitatif ve kantitatif analizler ile belirlenmiştir.

### **1.1. Biyofilmin Tarihçesi**

Biyofilm tanımı günümüzdeki halini alıncaya kadar çeşitli şekillerde açıklanmıştır. 17. yüzyıl'da, bu tanımların öncüsü mikroorganizmaların keşfiyle, Leewenhoek olmuştur. Dişi üzerinden almış olduğu örnekte, plaklar içinde yaşayan mikroorganizmaların varlığından bahsedilmiştir (Şekil 1.1). Fakat 1978 yılına kadar biyofilmin varlığından sözedilmemiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Rosan ve Lamont, 2000). Costerton 1978 yılında bakterilerin, yeterli besin bulunan yüzeylere tutunan bir matriks ile çevrili biyofilm içinde çoğaldığını söyleyerek, 'biyofilm' terimini ilk kullanan kişi olmuştur (Donlan ve Costerton,2002). Bundan sonra yapılan çalışmalarda özellikle derin yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç su ekosistemlerinde ve tüm doğal ekosistemlerde biyofilm oluşabildiği kabul edilmiştir (Costerton ve ark., 1978; Costerton ve ark.,1995; Sakarya, 2005; Yüksel, 2006).

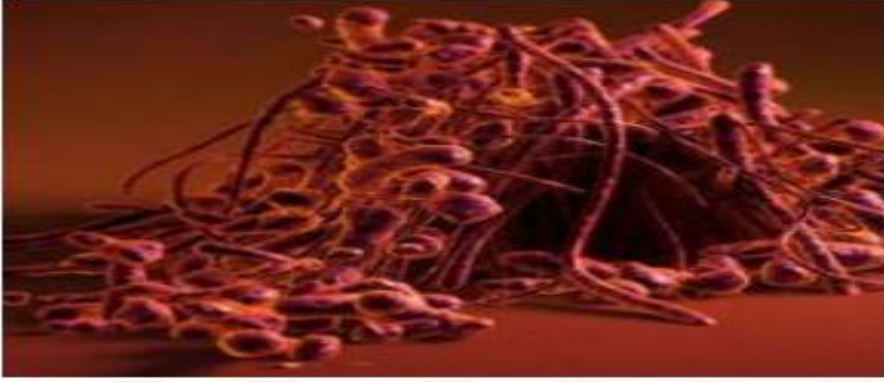
Biyofilm tanımı, son 30 yıl içerisinde elde edilen bilgiler ile geliştirilmiştir. Marshall 1976 yılında bakterilerin çeşitli yüzeylere yapışmasını sağlayan çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerden bahsetmiştir. Costerton ve ark. 1978, polisakkaritten oluşmuş glikokaliks matriksin bakterilerin gelişimini sağladığını ve adezyonu kolaylaştırdığını gözlemlemiştir. Yine Costerton 1987'de biyofilmlerin yüksek düzeyde su içeren (hidrate) anyonik ekzopolimer matriks ortamında bulunan mikrokoloniler meydana getirdiğini belirtmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Shu ve ark., 2000).



Şekil 1.1. Anton van Leeuwenhoek'un basit mikroskobu (Karamanou ve ark., 2010)

## 1.2. Biyofilm Tanımı ve Yapısı

Biyofilmin en yeni tanımı; canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi sentezlediği organik bir ekzopolisakkarit matrisi içine gömülü ve sabit olarak birbirine, katı bir yüzeye ya da bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan genetik yapı ve protein sentezi açısından oldukça farklı yapıda olan mikroorganizma topluluğu olarak yapılmıştır (Altun ve Şener, 2008; Davey, 2000; Jayaraman, 2008; Rolland ve ark., 2006; Rudney, 2000; Ten, 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006; Thurnheer ve ark., 2006).



Şekil 1.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005)

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmı sudan oluşmuştur. Matrikste bulunan diğer bileşenler; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Biyofilmin, bakteri yüzeyinde bulunandüzensiz dağılmış polisakkarit bir matriks olduğu düşünülmektedir. Mikroskopta incelenen biyofilminarasından kanalların geçtiği, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstraselüler yapıda toplanmasıyla mercan kayalıklarına benzeyen ve bunun üzerindeki piramid veya mantar şekilli uzantılardan oluştuğu görülmüştür. Çalışmalar sonucu matriksyoğunluğu ve genişliğinin var olan organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, ortamın doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebildiği bulunmuştur (Allison, 2003).

Biyofilm oluşumunun içeriği yüzde oran olarak Çizelge1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Biyofilm İçeriği (%)

No	Biyofilm İçeriği
1	%97 Su
2	% 2-3 Mikrobiyal Hücre
3	%1-2 EPS
4	%1-2 Protein
5	< %1-2 Nükleik Asit,Lipit

Biyofilm yapısında hücrelerin tutunmasını sağlayan yapı; polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matrikstir. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri önce mikrokolonileri oluşturur sonrasında mikrokoloniler büyüyüp gelişerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, biyofilm oluşumunun bir göstergesidir ve

organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gerekmektedir. Olgunlaşmış biyofilm ağırlığının %75–90' lık kısmı EPS 'den oluşmaktadır (Padera, 2006).

Biyofilm yapısı, saf kültürlerde türe, karışık kültürlerde ise substrata bağlıdır. Heterojen biyofilmler genelde düzensiz yapıdadır. Biyofilm yapısı, akışkanlık oranı, içinde bulunan türlerin yapısı ve tür çeşitliliğine göre belirlenir. Biyofilm kalınlığını belirleyen değer laminar ve türbülant akış arasında en yüksek seviyededir. Laminar alan kalınlığı substrata ulaşabilirlik değerine göre belirlenirken, türbülant akış ise aşınmaya bağlı değişiklik gösterir (Poulsen, 1999). Biyofilmlerin yoğun kıvamlı olduğu biliniyordu, son zamanlarda yapılan araştırmalarda su ve besin maddelerinin dağıtımı için kılcal yapıları su kanallarının bulunduğu bigisi eklenmiştir. Kılcal su kanalları mikrokolonilerin altında ve mikrokolonilerin arasında yer almaktadır. Bu kanallar biyofilm yapısına besin, oksijen taşıyarak metabolik atıkların biyofilmden yüzeye aktarılmasını sağlar (Costerton ve ark., 1995).

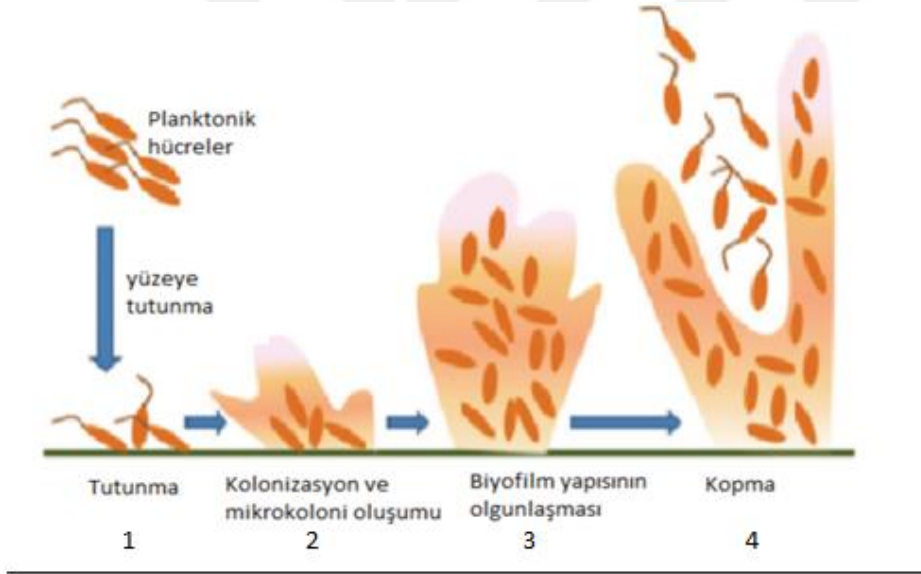
Tabakalaşmanın alttaki hücreleri sabitlediği, biyofilmden antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımını açısından değişkenlik gösteren yapılar olduğu vurgulanmıştır (Leriche ve ark., 2000; Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000). Protein, bakterilerin yüzeye tutunmasında en etkili organik bileşiklerden biridir. Biyofilm matriksi içinde düzenli dağılım gösteren yüzey proteinleri, EPS varlığında biyofilm oluşumunda etkili olabilmektedir. Biyofilm birleşmiş protein yapısı (BAP-Biofilm associated protein), organizmanın yüzeye tutunup çoğalması ve orada devamlı kalmasını sağlar (Lasa ve Penadés, 2006; Tormo ve ark., 2005).

Son yıllarda bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınma ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen sunumunu düzenleyen moleküller (AHL vs.) aracılığı ile biyofilm yapısının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda "Quorum Sensing" in önemini arttırmıştır (Stickler ve ark., 1998; Dong ve Zhang, 2005).

### **1.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Aşamaları**

Bakteri hücreleri doğada planktonik formda bulunabildikleri gibi canlı veya cansız bir yüzeyde adezyon sonrası çoğalarak mikroorganizma toplulukları halinde de

bulunabilir (Costerton ve ark.,1999). Biyofilm yapısı, mikroorganizmanın çoğalmasını sağlayan, olumsuz ortam koşullarına dayanıklı olmasında etkili, antibiyotik, dezenfektan madde gibi kimyasallara karşı dayanıklılık kazandıran önemli bir etkidir. Biyofilm oluşumu; polisakkarit, ekstraselüler DNA, protein, su ve iyonların bir araya gelmesini kapsayan etkin bir süreçtir (Marcinkiewicz ve ark.,2013; Fleming ve Rumbaugh, 2017). Biyofilm oluşumu 4 aşamada tamamlanır. Bunlar; Şekil 1.3'de de görüldüğü gibi tutunma, geri dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma evreleridir. (Lindsay ve Von Holy, 2006; Watnick ve Kolter, 2000).



Şekil 1.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları (Gupta ve ark.,2016). (1. Yüze tutunma 2.Mikrokoloni gelişimi 3. Olgun biyofilm oluşumu 4. Kopma ve planktonik planktonik faza geri dönüş, yeni biyofilm oluşumlarının başlaması)

### 1.3.1. Tutunma

Dönüşümlü basamak, mikroorganizma ve zeminin tam bağlanmayacak şekilde uzun aralıklı etkileşimlerin kurulduğu ilk evredir. Bunlar elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals bağları gibi zayıf etkileşimlerdir. Bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklü olduğu için kurulan elektrostatik etkileşimler daha çok itici güç şeklindedir (Poulsen, 1999; Costerton ve ark.,1995).

Yüzeye ilk temasın kurulmasında hidrofobik etkileşimin oldukça etkilidir (Costerton ve ark.,1995). Hücreler bu evrede, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile rahatlıkla uzaklaştırılabilirler. Bu evre, yapışan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın sonucunda gerçekleşir. Bu evrede bakteri yüzeye yakın fakat temas halinde değildir (Lindsay ve Von Holy, 2006).

### **1.3.2. Geri Dönüşümsüz Bağlanma**

Dönüşümsüz tutunma evresinde yüzey ile kısa mesafeli etkileşimlerden olan dipol-dipol bağları, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri kurulmaktadır. Bu aşamada mikroorganizmaların yüzeye dönüşümlü olarak bağlanabilmesi için besin miktarı önem teşkil etmeye başlamıştır. Bakteri hücrelerinin flagella, pili yapıları EPS oluşumu ile yüzeye dönüşümsüz bağlanmayı başlatmaktadır. Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller bulunduğundan, mikroorganizmalar materyele önce dönüşümlü, sonra da flagella ve fimbriaları ile dönüşümsüz olarak tutunurlar. Zemine tutunan bakteriler, yüzey proteinleri aracılığıyla EPS üretir. Ancak EPS üretmeyen bakterilerin de yüzeye bağlanabildiği görülmüştür. Bu aşamada yüzeylerin bakterilerden arındırılabilmesi için daha etkili yöntemler olan fırçalama ve kazıma gibi işlemlerin yapılmalıdır (Poulsen, 1999).

### **1.3.3. Kolonizasyon ve Mikrokoloni Oluşumu**

Tutunan bakteri gelişerek çoğalmaya başlar. EPS, planktonik haldeki diğer bakterilerin de yakalanmasını sağlar. Böylece yüzeyde ilk koloni oluşumu görülür. Aynı yüzeyde diğer bakterilerin de gelişmesiyle ikincil koloni oluşumu gerçekleştirilir. Biyofilmin büyümesiyle birlikte matris içinde kapsül oluşturan mikroorganizma sayısında da yükselme olur (Poulsen, 1999). Sonraki aşamada, mikrokoloniler büyüyerek mantar şekline benzeyen yapılara ya da kulelere dönüşürler. Konfokal lazer mikroskopi yöntemiyle yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekzopolisakarit içine gömülü mikrokoloniler şeklinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Farklı yüksekliklerdeki mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması amacıyla primitif bir dolaşım sistemi gibi çalışan su kanalları bulunmaktadır (Poulsen, 1999; Kumar ve Anand,1998).

### 1.3.4. Kopma

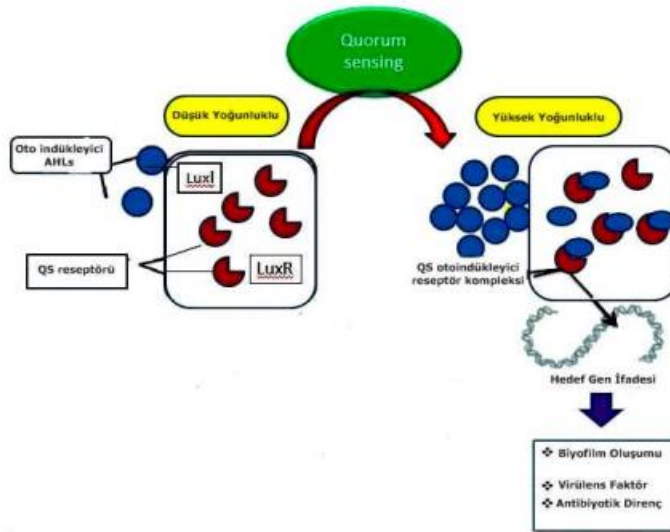
Biyofilm gelişiminin son aşaması olan kopma ya da ayrılma evresinde tek bir bakteri ya da bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının sonucu olarak da görülebilir (Poulsen, 1999).

### 1.4. Quorum Sensing (Yeterli Çoğunluğu Algılama)

Yüksek yapıli organizmalarda doku, organ ve vücudun hücreseI cevap oluşturması için hücreler arası sinyalleşme yöntemleri kullanılır. İnsan vücudundaki hücrelerde görülen bu metot diğere canlılar ve mikroorganizmalar için de bir gereksinimdir. Hücreler arası “Çoğunluk Algılanması” ya da “Quorum Sensing” (QS) şeklinde isimlendirilen bu mekanizmayla mikroorganizmalar üretilen sinyal moleküllerinin miktarını ölçebilirler ve etraflarında bulunan diğere mikroorganizmaların miktarını da algılayabilirler. Bu olay sayesinde koloni şeklinde göstermeleri gereken davranış biçimlerini, bir hücreden diğere sineal molekülleri aracılığıyla iletilebilmektedir. Tercih edilen biyo-sinyallerin yapısına göre, hücrelere girişte çeşitli izyolların kullanıldığı bilinmektedir (Gülgör ve ark., 2014). Quorum sensing, ilk defa Neelson ve ark. (1970) tarafından *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*'de biyoluminesans araştırılması sırasında bulunmuştur. Günümüze dek QS'in biyofilm oluşumu, virulans adaptasyonu, antimikrobiyal madde üretimi, hareket, sporulasyon gibi gen düzenlenmesinin birçok mekanizmalarında görev yaptığı belirlenmiştir (Kaya ve ark., 2014). Hücreler arası iletişimde görevli bu sistem, kendi kendine sinyal üreten ve “Otoindükleyici” şeklinde isimlendirilen moleküllerden oluşmaktadır. Bu moleküller sentezlendikleri hücrenin metabolizmasında düzenleyici etkiye sahiptir. Bazı mikroorganizmaların ise birden fazla sayıda ve çeşitli QS molekülleri kullandıkları bilinmektedir. Çoğunluk algılanması, mikroorganizmalarda türler arası ve tür içi olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Gram negatif bakterilerde türe göre değişiklik göstermekle beraber, oto-indükleyici olarak N-açıl homoserin ve oligopeptidler, gram pozitif bakterilerde ise genellikle oligopeptidler kullanılmaktadır. QS çalışmalarında temel nokta, mikrobiyal çoğunluk algılanma mekanizmasının işleyişini tespit etmektir. Bu sistemi engelleyerek veya sistemin işleyişini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulması hedeflenmektedir



(Gülgör ve ark., 2014). Gram Negatif ve Gram Pozitif Bakterilerde Quorum Sensing Mekanizmaları (QS) bakterileri çevreleyen ortamda hücre yoğunluğuna göre birbirleriyle iletişim kurmalarını sağlayan moleküler mekanizmadır (Şekil 1.4). Bu iletişim sisteminde düşük hücre yoğunluğunda bakterilerin etkili olmayan süreçleri üstlenmesini sağlamakta fakat yüksek hücre yoğunluğunda virülans faktör üretimi, biyofilm, proteaz ve siderofor üretimi ile bütün kominiteye yarar sağlamaktadır (Rémy ve ark., 2018). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde Quorum Sensing mekanizmasında kullanılan moleküller farklılık göstermekle beraber bir furanosil borat diesteri olan AI-2, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde ortak olarak kullanılmaktadır (Remy ve ark., 2018).

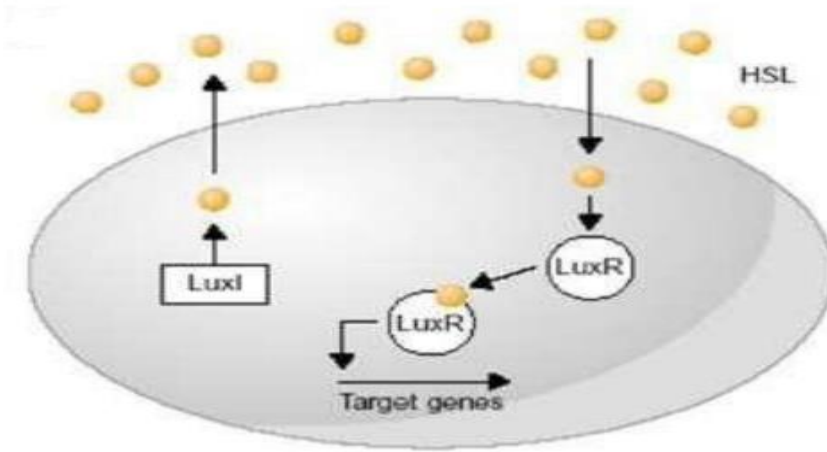


Şekil 1.4. Quorum Sensing Mekanizması (Abraham ve ark., 2018)

#### 1.4.1. Gram Negatif Bakterilerde Quorum Sensing Mekanizması (Çoğunluğu Algılama)

Gram negatif bakterilerin kullandığı en iyi bilinen ve anlaşılan Quorum Sensing mekanizması LuxI-LuxR sistemidir (Şekil 1.5.a). Bu sistemde Gram negatif bakteriler için temel sinyal molekülü olarak N-açil homoserin lakton (AHL) 'lar kullanılır. Bunun yanında, LuxI veLuxR genlerinden sentezlenen LuxR ve LuxI gibi proteinler de görev alır. Bu sistem AHL sinyal moleküllerinin sentezlenmesi ve geri alınmasına dayanmaktadır. Bu sistem iki aşamadan oluşmaktadır. İlk

aşamada LuxI proteini AHL sinyal molekülünün sentezlenmesini sağlarken, ikinci aşamada ise LuxR proteini AHL sinyal moleküllerine bağlanarak bu moleküllerin alınması sağlamaktadır. LuxI proteininin sentezlediği AHL sinyal molekülleri difüzyonla ortama dağılır. Populasyon yoğunluğunun artması sonucu ortamda biriken AHL sinyal molekülleri difüzyonla hücre içine alınarak LuxR proteinine bağlanır. Bu sinyal molekülü LuxR transkripsiyon aktivatöre bağlanır ve bu molekül kompleksi hedef genin transkripsiyonunu uyararak diğer yandan daha çok AHL sinyal molekülü oluşması için LuxI proteininin üretilmesini sağlayan genleri aktive eder (Hamidi, 2015).

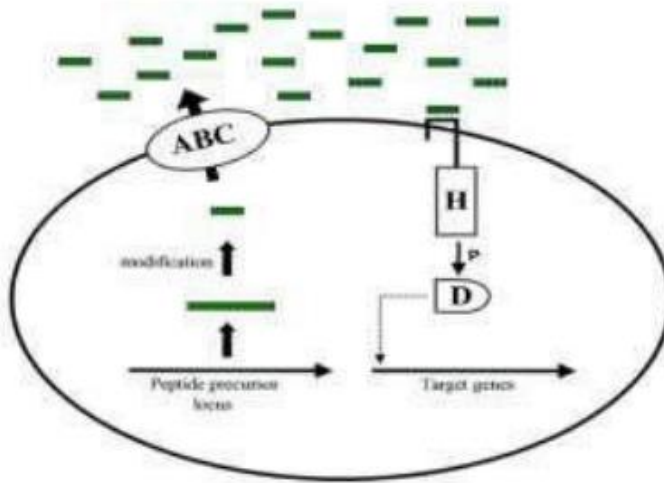


Şekil 1.5.a. Gram negatif bakterilerde LuxI-LuxR sistemi (Hamidi, 2015)

#### 1.4.2. Gram Pozitif Bakterilerde Quorum Sensing Mekanizması (Çoğunluğu Algılama)

Oligopeptid sinyalizasyonu Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan Quorum Sensing mekanizmasıdır. Bu sistem Gram negatif bakterilerin kullandığı sistemden daha gelişmiş ve daha farklıdır. Bu sistemde ilk olarak oligopeptid yapıdaki sinyal molekülü öncü peptid olarak sentezlenir ve daha sonra hücre içinde işlenerek olgun oligopeptid otoindükleyici haline getirilir. Olgun hale gelmiş olan bu sinyal molekülleri ATP-Binding Casette (ABC) taşıyıcı kompleksinin yardımı ile ortama salınır. Sinyal molekülü algılama mekanizmasındaki bileşenleri hücre sayısındaki artışla birlikte eşik değere ulaşmış oligopeptid sinyal moleküllerini tanımlar. Bu bileşenlerin birincisi hücre zarında protein yapılı reseptör olan histidinkinazlar (H)

iken ikincisi histidinkinazın aktive ettiği transkripsiyon faktörü (D) denilen proteinlerdir. Sinyal molekülleriyle etkileşen histidinkinazlar hücre içine doğru fosforile olurlar ve TF'yi fosfatlayarak aktive ederler. TF'ler aktive olduktan sonra ilgili genleri aktive edip ekspresyonlarını sağlarlar. Böylece bakteri türüne özgü olan Quorum Sensing davranışları ortaya çıkar (Hamidi, 2015) (Şekil 1.5.b).



Şekil.1.5.b. Gram pozitif bakterilerdeki quorum sensing mekanizması (Hamidi, 2015).

### 1.5. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen İç ve Dış Faktörler

Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler; iç ve dış faktörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

İç faktörler; su aktivitesi, antimikrobiyal madde içeriği, pH değeri, besin maddelerinden faydalanma durumu, oksijen ihtiyacı ve elektriksel değişkenlik gibi faktörlerdir.

Dış faktörler ise yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı ve sınırlı besin maddesidir (Douglas, 2003).

Biyofilm içerisindeki oksijen yoğunluğu mikrobiyal direncin gelişmesinde önemlidir. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda

anaerobik ortam oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin etkinliği azalmakta ve antimikrobiyal direnci geliştirmektedir. Ayrıca biyofilm içerisinde bakteri metabolizması sonucu oluşan asidik atık maddelerden dolayı pH'nın değişmesi ve bu değişimin bazı antibiyotikler üzerinde antagonistik etkileri bulunmaktadır (Mah ve O'Toole,2001; Altun ve şener, 2008). Biyofilm, içindeki bakterilerin birbirine antibiyotiğe direnç genlerini aktarmasını kolaylaştırarak bakterilerin dirençli hale gelmesine yardımcı olur (Savage ve Chopra,2013).

Kateterler, yapay kalp kapakları, eklem replasmanları mikroorganizmaların rahatlıkla tutunabildikleri kritik yüzeylerdir (Mah ve O'Toole, 2001). Bakteriler ve mayalar, kullanılan tıbbi aletler üzerinde biyofilm oluşturulabilmektedir. Bu mikroorganizmalara kaynak, hastanın kendi florası, sağlık çalışanlarının elleri, eşme suyu ya da çevresel yüzeyler olabilmektedir (Donlan ve Costerton, 2002).

Besin gradienti, metabolik atıklar ve ortamdaki uyaranlar, biyofilm tabakasında yer alan mikroorganizmaların metabolizma hızında değişikliğe neden olmaktadır. İlk defa 1990 yılında Characklis ve Marshall tarafından kullanılan heterojenite kavramı, antimikrobiyal cevabı etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Akridin orange boyama tekniğiyle yaklaşık RNA-DNA oranına göre hızlı ve yavaş çoğalan canlılar gözlemlenmektedir (Donlan ve Costerton, 2002).

Kullanılan antimikrobisyonların ortak özelliği, metabolik olarak aktif ve çoğalan mikroorganizmalar üzerine etkili olmasıdır. Metabolizma ve çoğalma hızının düşmesi, mikroorganizmayı olumsuz evre koşullarından korunması için verilen stres yanıtıdır. Mikroorganizmada rpoS (stres düzenleyici protein) gen bölgesi aracılığıyla kontrol edilen stres yanıtı, aynı zamanda biyofilm oluşumunu uyarmaktadır. rpoS kaybı olan *Escherichia coli* hücrelerinin normal bir biyofilm yapısı oluşturamadıkları görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa*'da salgılanan ilave bir stres faktörü de AlgT olup, rpoS ile beraber çalışmaktadır (Mah ve O'Toole 2001; Foley ve ark., 1999).

## **1.6. Biyofilimde Antimikrobiyal Direnç Mekanizması**

Antimikrobiyal direnç mikrobiyal gelişimi durdurmaya veya yok etmeye yönelik uygulanan antimikrobiyal bir maddeye karşı bir mikroorganizmanın verdiği yanıtıdır. Mikroorganizmalar çok farklı yöntemlerle direnç gösterebilmektedirler

(Verraes ve ark.,2013). Antimikrobiyal etki, etken madde ile mikrobiyel hücredeki spesifik hedefler (hücre duvarı, sitoplazmik membran, membran enzimleri, sitoplazma ve genetik materyaller) arasındaki etkileşim olarak tanımlanabilir. Hücre duvarı farklılığında kaynaklı ek bir korumaya sahip olan gram negatif bakteriler gram pozitif bakterilere göre antimikrobiyel maddelere karşı daha dirençlidirler (Araujove ark., 2011). Direnç çeşitleri içsel veya doğal (fenotipik), kazanılmış (genotipik) ve mutasyon olmak üzere üç çeşittir. Doğal veya içsel direnç, mikroorganizmanın kalıtsal özelliklerinden kaynaklanan cinse veya türe özgü antimikrobiyel maddelere dayanabilme yeteneğidir. Genellikle plazmitlerin aracılık ettiği kazanılmış dirençte ise bakteriler yatay gen transferiyle antibiyotiğe karşı direnç kazanabilirler. Bu direnç mekanizması ile bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türden başka bir bakteriye hatta farklı türden bakterilere bile aktarılabilir. Son olarak mutasyonlar ise direnç geliştirilmesinde çok da fazla rol oynamamakla birlikte genomda bulunan birden fazla bölgede genetik değişikliklere sebep olabilirler (Bridier ve ark., 2011; Araujo ve ark., 2011). Bağlı hücreler planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında antimikrobiyallere karşı daha dirençli bir yapıya sahiptirler (Meyer,2003; Araujo ve ark., 2011). Bu da biyofilm yapısının antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen veya azaltan bariyere sahip olmasından kaynaklıdır (Bridier ve ark.,2015; Akan ve Kınık, 2014; Kubota ve ark., 2009). Biyofilmlerin antimikrobiyellere karşı oluşturdukları yaygın direnç mekanizmaları “ekzopolisakkarit matriksi, enzimler, heterojenlik, hücresel persistans, metabolik aktivite, genetik adaptasyon, kitle algılama, stres cevapları, dış membran yapısı ve sızdırma pompaları” şeklinde sıralanabilir (Araujo ve ark.,2011).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyofilm oluşumunun tıp, sağlık, gıda, sanayi gibi birçok alanda ciddi problemler yarattığı bilinmektedir. Bu sıkıntıların önüne geçebilmek için biyofilm yapısı, oluşumu ve biyofilm oluşturan bakterilerin tanımlanması için hem ülkemiz hem de dünya üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Gıda kaynakları içerisinde et, süt ve su ürünlerinde birçok çalışma yapılmış fakat bu çalışmalarda genellikle fabrika ve üretim tesislerine ağırlık verilmiştir. Gıdaların halka sunulması, satış tezgahları ve muhafaza alanında yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır.

### 2.1. Dünya’da Yapılan Çalışmalar

Speranza ve ark. (2020), farklı yüzeylere (yani ambalaj malzemeleri, seramik, plastik, kağıt, polimerler vb.) yapışabilen probiyotik bakterilerin, patojenik ve bozulma bakterilerinin büyümesini biyolojik olarak kontrol ederek endüstriyel uygulamalar için yeni biyoteknolojik çözümler olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, çalışılan biyofilmin bazı patojenik hedeflerin büyümesini geciktirebildiğini göstermiştir; aslında, hücrel patojenik yükler, probiyotik biyofilm varlığında, yokluğuna kıyasla her zaman daha düşüktür.

Ling ve ark. (2020), geleneksel temizleme ve sterilizasyon prosedürlerinin, biyofilm kontrolü için yetersiz olduğunu ve biyofilmin yayılmasına neden olabileceğini düşünerek, mücadele için nanoteknoloji tabanlı uygulama sistemlerinin geliştirilmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir. Bu konuda, biyofilm oluşumu ve davranışının altında yatan mekanizmaları çalışmak için *Cronobacter sakazakii*'nin uygun bir tür olduğunu bildirmişlerdir.

Kırmusaoğlu (2019), biyofilm oluşumunda görevli genlerin tanımlanması, antibiyofilm ve ajanların antibakteriyal aktivitesinin ölçülmesinin biyofilm çalışmalarında önemli olduğunu vurgulamışlardır. Yaptığı çalışmada mikroskopi, floresan in situ hibridizasyon ve Congo kırmızı agar, tüp yöntemi, mikrotitre plaka testi, dama tahtası testi, plaka sayımı, polimeraz zincir reaksiyonu, kütle spektrometresi, MALDI-TOF gibi doğrudan ve dolaylı yöntemlere genel bir bakış sağlamıştır.

Chen ve ark. (2020), *Staphylococcus aureus* suşları arasında biyofilm oluşumunu sağlayan genlerin prevalansındaki farklılıkları belirlemek için, 97 *S. aureus* suşunu kolorimetrik mikrotiter plaka testi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Sonuçta *S. aureus* suşları arasında biyofilm oluşturma kabiliyetinde önemli farklılıklar olduğunu ve bunun sebebinin de adhezin kodlayan genlerin prevalans farklılığı kaynaklı olduğunu tespit etmiştir.

Zhao ve ark. (2017), biyofilmlerin inhibisyonun doğal biyolojik ajanlar tarafından quorum sensing mekanizmasını inhibe ederek gerçekleştirilebileceğini ve böylece biyofilm problemlerinin çözümüne yardımcı olacağını bulmuşlardır.

Qi ve ark. (2016), *Acinetobacter baumannii* izolatları arasında bireysel farklılıkların olduğunu ve bu türün antibiyotik direnci, biyofilm oluşumu ile biyofilm ve spesifik direnç arasında istatistiksel olarak bir korelasyonun varlığının bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu genlerin belirlenmesinin, *A. baumannii*'nin biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara karşı mücadelede etkili olacağı düşünülmüştür. Oliveira ve ark. (2015), *Pseudomonas aeruginosa* suşlarıyla yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda antibiyotik uygulanmasının, biyofilm oluşumunda artışa neden olan doğal bir tepki davranışı olduğunu bildirmişlerdir. Winkelströter ve ark. (2014), biyofilm oluşumunu kontrol etmek, önlemek ve yüzeylere bağlanan bakterileri tespit etmek için son zamanlarda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA mikrodizisi ve konfokal lazer tarama mikroskobu dahil bir dizi yeni teknik ile ilgili bilgiler vermişlerdir.

Fenton ve ark. (2013), olgun bir stafilokokun biyofilm oluşumu için genellikle 24 saatlik bir inkübasyon süresi yeterli iken yaptıkları çalışmada, sığır mastitis izolatlarının 24 saatin altında olgun bir biyofilm oluşturabildiğini göstermişlerdir.

Madsen ve ark. (2012), plazmit aracılığıyla gerçekleşen yatay gen transferinin planktonik durumdakilere kıyasla biyofilm topluluklarında tipik olarak daha yüksek oranda gerçekleştiğini açıklamıştır.

Bai ve ark. (2011), gıdalarda bozulmaya sebep olarak quorum-sensing algılayan sinyal moleküllerinin rol oynadığını saptamışlardır. Quorum-sensing inhibitörlerinin, gıda güvenliğini artırmak ve raf ömrünü uzatmak için gıda

koruyucu olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

## 2.2.Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Koç (2020), *Listeria innocua* bakterisinin oluşturduğu biyofilmlerin absorbans değerleri ölçerek, biyofilm oluşum oranlarını saptamıştır. *L. innocua* tarafından üretilen biyofilmlere karşı antibiyofilm özelliği gösteren *Bacillus coagulans*'ın etkileşimini test ederek, biyofilm oluşumununinhibasyonunu göstermiştir.

Çonker (2019), yaptığı çalışmasında x CELLi gence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin, prokaryotik biyofilm çalışmalarında başarıyla kullanılabilceğini ve bakteriyal biyofilm çalışmalarında kullanılan kristal viyole metodu gibi kolorimetrik metotların vakit alıcı ve güvenilirliğinin düşük olması sebebiyle x CELLi gence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin kristal viyole yöntemine göre daha üstün olduğunu göstermiştir.

Ülgen (2019), ketencik (*Camelina sativa*) tohum yağı ekstraktlarının biyofilm oluşumları üzerine araştırma yapmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre ketencik tohum yağı ekstraktlarının diğer bakterilere kıyasla *Salmonella infantis* bakterisine karşı yüksek antibiyofilm aktivitesi gösterdiği ve ekstratın (80 µl/ml) biyofilm oluşumunu %47,45 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Tohum yağından hazırlanan ekstratların *Bacillus subtilis*'e karşı antibiyofilm aktivitesi göstermediği saptanmıştır. Karaman (2019), tavuk örneklerinde yapılan çalışmada *Arcobacter* türlerinin ve sitoletal distending toksin (CDT) geninin varlığını araştırmıştır. *Arcobacter* türlerinin genellikle zayıf ve orta derecede biyofilm oluşturduğu görülmüşve aynı ortamı paylaşan farklı tür bakteriler arasında yatay gen aktarımlarının gerçekleşebileceği olasılığı test edilmiştir. Ortamdan izole edilen *Campylobacter* türlerinde cdt genine rastlanmamıştır.

Koçakoğlu (2018), 5 adet *Saccharomyces cerevisiae* suşunun farklı pH, sıcaklık, tuz, potasyum sorbat ve gliserin konsantrasyonlarında biyofilm üretme kapasitesindeki değişikliklerin tüp yöntemi ve 96 kuyucuklu plaka yöntemiyle incelenmesini araştırmıştır. Çalışma sonucunda 30°C’de biyofilm üretiminin en yüksek seviyede olduğu ancak sıcaklığın 40°C’ye ulaşmasıyla birlikte biyofilm oluşum miktarında bir azalış görüldüğü tespit edilmiştir. Tuz, potasyum sorbat ve gliserin miktarındaki artış *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının biyofilm üretme



kapasitesini olumsuz yönde etkilemiştir. Suşların en yüksek biyofilm oluşturduğu ortam koşullarının pH 5,0 ve 30°C sıcaklıkta olduğu gözlemlenmiştir. Farklı pH değerlerinde biyofilm oluşumunda önemli bir değişim görülmemiştir. Şar ve ark. (2018), süt ürünleri ile ilgili fabrikalarda yaptıkları çalışmada, *Bacillus cereus* gibi spor oluşturan gıda patojenlerinin biyofilm oluşumlarının sitrik asit kullanılarak kontrol altına alınabileceğini göstermişlerdir. Yedikardeş (2016), su ile temas eden yüzeylerde yüksek oranda biyofilm oluşumunun varlığını gözlemlenmiştir. Bu nedenle mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını, tutunduğu yüzeyde çoğalmasını ve biyofilm oluşturmalarını önlemek amacıyla antibakteriyel kaplamalar geliştirilmiştir.

Şimşek (2014), Ti implantlarda kullanılan PEO/PEG tabanlı kaplamaların, bakteriyel enfeksiyonun oluşmasını engellediğini ve bakteriyel enfeksiyonu tetikleyen protein adsorpsiyonunun azaltılmasında bakteri/hücre yapışmasını önlediğini göstermiştir.

Güler ve ark. (2013), peri-implantitisin cerrahi tedavisinde, implant yüzey dekontaminasyonu aşamasında mekanik tedaviye ilave olarak kimyasal solusyonların kullanılması ve operasyonun sistemik antibiyotik ile desteklenmesi ile daha başarılı klinik sonuçlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Gelecekte titanyum döner fırçalarının cerrahi işlem sırasında hızlı, pratik olması ve yüzeye zarar vermemesi sebebi ile rutin klinik uygulamalarda kullanımında artış olabileceğini belirtmişlerdir.

Yörük (2012), yaptığı çalışmada sucuk, salam, sosis ve hamburger köfte numunelerinin rutubet ve pH değerleri ile mikrobiyolojik sonuçlarını değerlendirerek, elde edilen değerlerin ISO belgesi ve HACCP kurallarına uygun olup olmadığını göstermiştir. Elde ettiği verilere göre; kullandığı ürünlerin gıda patojenleri ile kontamine olduğunu ve gıda üretim yerlerinde, gıda güvenliği kurallarının uyulmadığını saptamıştır.

Karaca (2011), polistiren plaklarda seçilen suşlarda biyofilm üretme seviyelerinin ölçülmesi sonucunda en fazla biyofilm üretiminin *Salmonella typhimurium* suşunda (OD:3,418) olduğunu saptamıştır. İdeal biyofilm üretimi şartlarının belirlenmesi için farklı sıcaklık, su aktivitesi ve pH değerlerinde yapılan çalışmalar sonucunda, biyofilm oluşumu için en ideal sıcaklığın 20°C, NaCl

konsantrasyonunun % 0.0 olduğu belirlenmiş ve farklı özellik içeren suşların biyofilm oluşturma özellikleri üzerindeki etkisinin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Matriks yapısında bulunması muhtemel hücre dışı DNA'nın varlığı “bdar” morfortipi içeren *Salmonella infantis* suşunda tespit edilmiştir.

Arslan (2009), diş üzerindeki bakteriyal biyofilmin kontrolünde Türk propolisinin etkisini incelemiş ve diş çürüklerinin azaldığını gözlemlemiştir. Türetken (2005), su sirkülasyon sistemlerinde sıklıkla görülen biyofilm tabakasının oluşumunu incelemek için *Legionella pneumophila* bakterisini kullanmıştır. Kontrol malzemesi olarak sistemde kullanılan cam, çelik, bakır yüzeylere kıyasla plastik malzemelerde özellikle polivinil klorür (PVC) ve polietilen de (PE) önemli derecede daha az bakteri ve EPS barındırdığı tespit edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Örneklerin Toplanması ve İzolatların Saflaştırılması

##### 3.1.1. Örneklerin Toplanması

Örnekler 2018 yılı Ekim ayında Aydın ilimizde açıkta satışı yapılan peynir, zeytin, tavuk, simit, tatlı, çiğ köfte, balık, midye, tost, et- tavuk döner satış tezgâhları, gıda yüzeyleri ile gıdaya temas eden metal ve cam yüzeylerden alınmıştır. Alınan örnekler steril eküvyon kullanılarak 2mL'lik Triptik Soy Broth (TSB) içine alınmış ve +4°C'de 4-6 saat içinde laboratuvar ortamına getirilmiş ve deneme aşamasına kadar soğuk ortamda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Açık pazar yerinde örnek alınan peynir tezgâhı (Aydın)

##### 3.1.2. İzolatların Saflaştırılması

Soğuk ortamda muhafaza edilen örnekler, zenginleştirme işlemi için Triptik Soy Broth (TSB) (2mL) besi ortamına inokule edilmiştir. İnokule edilen besi ortamı 37°C'de 24 saat inkübe edilerek, bir seri seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Petriler içinde hazırlanan Triptik Soy Agar (TSA) besi ortamına  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  - $10^{-6}$  seyreltme tüplerinden yayma ekim yapılarak, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra petrilere oluşan koloniler, koloni morfolojilerine göre seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılan izolatlar içinde %20 Skim Milk bulunan kryo tüplerde -18C°'de muhafaza edilmiştir.

### 3.1.3. Besi Ortamları

#### Besi ortamı 1: Triptik Soy Broth (TSB) (Merck)

Çizelge 3.1. TSB besiyortamı bileşenleri

<b>TriptikSoy Broth</b>	
<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Kazein pepton	17,0 g/L
D (+) glikoz	2,5 g/L
Soymeal pepton	3,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g/L

Besi ortamının hazırlanması için 24 gram besi ortamı tartılıp, 1 litre distile su içerisinde homojen şekilde karıştırılmıştır. Karışımın sterilizasyonu 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sağlanmıştır. Bu besi ortamı zenginleştirme için kullanılmıştır.

#### Besi ortamı 2: Triptik Soy Agar (TSA) (Merck)

#### Triptik Soy Agar (TSA) (Merck)

Çizelge 3.2. TSA besiy ortamı bileşenleri

<b>Triptik Soy Agar (TSA)</b>	
<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Kazein pepton	17,0 g/L
Soymeal pepton	3,0 g/L
Sodyum klorür	5,0 g/L
Agar- Agar	15,0 g/L

Besi ortamının hazırlanması için 37 gram besi ortamı tartılıp, 1 litre distile su içerisinde homojen şekilde karıştırılmıştır. Karışımın sterilizasyonu 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sağlanmıştır. Bu besi ortamı bakterilerin gelişimi için kullanılmıştır.

### **Besi ortamı 3: Kongo Red Agar (CRA) (Merck)**

Çizelge 3.3. Kongo Red besi ortamı bileşenleri

<b>Kongo Red Agar (CRA)</b>	
<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Brain Heart Infusion	37,0 g/L
Sukroz	5,0 g/L
Kongo kırmızısı boyası	0,8 g/L
Agar -Agar	15,0 g/L

Besi ortamının hazırlanması için 37 gram Brain Heart Infusion, 5 gram sukroz, 0,8 gram Kongo kırmızı boyası, 15 gram agar-agar tartılarak, 1 litre distile su içerisinde homojen şekilde karıştırılmıştır. Karışımın sterilizasyonu 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sağlanmıştır. Bu besi ortamı biyofilm oluşumunu gözlemlemek için kullanılmıştır.

### **3.1.4. Çözeltiler**

#### **Çözelti 1: %20'lik Skim Milk (Merck)**

Çizelge 3.4. %20'lik skim milk

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Skim milk	20 g
Distile su	100 mL

20 gram skim milk, 100 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılır. Hazırlanan karışım, 118°C'de 10 dk otoklavlanarak, sterilize edilir. Bu çözelti, bakterileri kültürlerini -18°C'de muhafaza etmek için kullanılmıştır.

## Çözelti 2: Kristal Violet Boyası

Çizelge 3.5. Kristal Violet boyası

Bileşen	Miktar
Kristal violet	2 g
%95'lik etil alkol	20 mL
Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80 mL

Bir beher içinde 2 gram kristal violet boyası, 20 mL etil alkol içinde çözdürülür. Ayrı bir beher içinde 0,8 gram amonyum oksalat, 80 mL distile su içerisinde çözdürülür. Üzerine etil alkol içerisinde çözdürülmüş olan kristal violet çözeltisi eklenir. Bu çözelti, Gram boyamada bakteri hücre yapısını incelemek için kullanılmıştır.

## Çözelti 3: İyot Solüsyonu

Çizelge 3.6. İyot solüsyonu

Bileşen	Miktar
İyot	0,1 g
Potasyum iyodür (KI)	0,2 g
Distile su	100 mL

0,1 gram iyot ile 0,2 gram potasyum iyodür poselen havan içerisinde iyice ezilir ve 100 mL distile eklenip, homojen bir şekilde karıştırılır. Bu çözelti, Gram boyamada kullanılmıştır.

## Çözelti 4: Safranin Çözeltisi

Çizelge 3.7. Safranin çözeltisi

Bileşen	Miktar
Safranin boyası	0,025 g
%95 etil alkol	1 mL
Distile su	100 mL

0,025 gram safranin boyası, 1 mL %95 etil alkol içerisinde çözdürülerek, üzerine 100 mL distile su eklenir ve homojen bir şekilde karıştırılır. Karışım, filtre kağıdı ile süzülür. Bu çözelti, Gram boyamada kullanılmıştır.

### Çözelti 5: Proteinaz K

Çizelge 3.8. Proteinaz K

Bileşen	Miktar
Proteinaz K	0,02 g
Distile su	1 mL

0,02 gram proteinaz K, 1 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu çözelti, DNA izolasyonu sırasında proteinleri parçalamak için kullanılmıştır.

### Çözelti 6: %20'lik Sodyum Dodesilsülfat (SDS)

Çizelge 3.9. %20 SDS

Bileşen	Miktar
Sodyum dodesilsülfat	2 g
Distile su	10 mL

2 gram sodyum dodesilsülfat, 10 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu çözelti DNA izolasyonunda proteinlerin yapısını bozmak için kullanılmıştır.

### Çözelti 7: RNase Solüsyonu (20 µg/mL)

Çizelge 3.10. RNase solüsyonu

Bileşen	Miktar
RNase	0,02 g
Distile su	1 mL

0,02 gram RNase, 1 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

**Çözelti 8: Lizozim Solüsyonu (20 mg/mL)**

Çizelge 3.11. Lizozim solüsyonu

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Lizozim	0,1 g
Distile su	5 mL

0,1 gram lizozim, 5 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu çözelti, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

**Çözelti 9: Agaroz Jel Çözeltisi (% 0,5)**

Çizelge 3.12. Agaroz jel çözeltisi

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Agaroz	1 g
Distile su	100 mL

1 gram agaroz, 100 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu çözelti, izole edilen DNA'ların, agaroz jel elektoroforezinde görüntülenmesinde kullanılmıştır.

**Çözelti 10: Sodyum Asetat (3M- pH 3,5) Çözeltisi**

Çizelge 3.13. Sodyum asetat çözeltisi

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Sodyum asetat	0,20 g
Distile Su	100 mL

0,20gram sodium asetat, 100 mL distile su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım, DNA izolasyonu için hazırlanmıştır.



### Çözelti 11: Tris-Brot EDTA (0,5X TBE) Tamponu

Çizelge 3.14. TBE tamponu

Bileşen	Miktar
Tris-base	54 g
Borik asit	27,5 g
EDTA.2H <sub>2</sub> O (0,5 M; pH 8)	20 mL
Distile su	1000 mL

54-gram tris-base, 27,5-gram borik asit üzerine 20 mL EDTA eklenerek, homojen bir şekilde karışımı sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 1000 mL distile su ilave edilerek, karıştırılmıştır. Bu tampon çözeltisi, agaroz jel için hazırlanmıştır.

### Çözelti 12: Fenol- Kloroform Çözeltisi

1 hacim fenol, 1 hacim kloroform (v/v) birbiri üzerine eklenmiştir. Bu karışım, DNA izolasyonunda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

### Çözelti 13: Etil Alkol Solüsyonu (% 70)

Çizelge 3.15. Etanol solüsyonu (% 70)

Bileşen	Miktar
%95 Etanol	7,3 mL
Distile su	92,7 mL

7,3 mL %95 etil alkol üzerine 92,7 mL distile su ilave edilmiştir. -18°C'de bekletilerek, soğuk olarak DNA izolasyonunda kullanmak için hazırlanmıştır.

### Çözelti 14: Kovaks Solüsyonu

Çizelge 3.16. Kovaks solüsyonu

Bileşen	Miktar
Para-dimetil aminobenzaldehit	5g
Bütanol	75 mL
Hidroklorik asit (% 37)	25 mL

5-gram para-dimetil aminobenzaldehit, 75 mL butanol içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmış ve benmari içinde hafifçe ısıtılarak, karışımın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine % 37'lik hidroklorik asit ilave edilmiştir. Bu karışım, indol testi için hazırlanmıştır.

### Çözelti 15: $\alpha$ -Naftol Solüsyonu

Çizelge 3.17.  $\alpha$ -Naftol solüsyonu

Bileşen	Miktar
$\alpha$ -naftol	5 g
Etil alkol (% 95)	100 mL

5 gram  $\alpha$ -naftol üzerine 100 mL etil alkol eklenmiş ve homojen bir şekilde karışımı sağlanmıştır. Bu karışım, biyokimyasal testlerden VP testi için hazırlanmıştır.

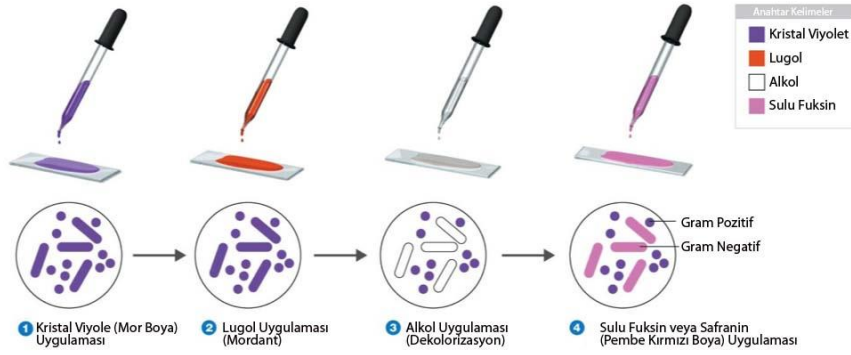
## 3.2. İzolatların İdentifikasyonu

### 3.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri

Saflaştırılan izolatların Gram boyamaları yapılarak, ışık mikroskobu altında hücre morfolojileri incelenmiştir. İncelenen izolatların, sahip oldukları hücre duvarı yapısına göre Gram özellikleri belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu yöntemde; aktiveleştirilen kültürden bir öze dolusu alınıp, lam üzerindeki bir damla suyun içerisinde ince bir film tabakası şeklinde yayılmıştır. Havada kurutulan preparatlar 3'er defa bek alevinden geçirilerek fikse edilmiştir. Daha sonra preparata boyama işlemi yapılarak, immersiyon yağı ile 100'lük objektifte incelenmiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

Çizelge 3.18. Gram boyama işlemi

Çözeltiler	Süre
Kristal viyoleto boyası	1 dk
İyot solüsyonu	1 dk
Etanol (%95)	15 sn
Safranin çözeltisi	1 dk



Şekil 3.2. Gram boyama aşamaları

### 3.2.2. İzolatların Kültürel Özellikleri

Besi ortamında gelişen kolonilerin yüzey, biçim, kenar, yükselti, büyüklük, pigmentasyon, kolonin mat-parlak gibi özellikleri incelenmiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### 3.2.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özelliklerinden başlıca katalaz testi, karbohidrat fermentasyonu, nişasta hidrolizi, üre hidrolizi, hidrojen sülfid üretimi, IMVIC testleri yapılmıştır (Bergey ve ark., 2015).

#### 3.2.3.1. Katalaz Testi

Besi ortamında gelişen bakteri kolonisi üzerine hidrojen peroksit (%30) çözeltisinden bir damla damlatılmıştır. Koloni üzerinde hava kabarcıklarının çıkışının görülmesi, testin pozitif olduğunu göstermektedir (Çotuk ve Sungur, 2014).

#### 3.2.3.2. Karbohidrat Fermentasyonu

Aktifleşen kültürden, içinde sukroz, glikoz, laktoz ve indikatör boya olarak fenol kırmızısı bulunan besi ortamına inokülasyon yapılarak, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi ortamının renginin kırmızıdan sarıya dönmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.3. Nişasta Hidrolizi**

Nişasta içeren besi ortamına bakteri inokulasyonu yapılarak, inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerin üzerine Gram iyodür solusyonundan 1-2 damla damlatılmıştır. Koloninin etrafında şeffaf bir zon oluşması, nişasta hidrolizinin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.4. Üre Hidrolizi**

Bu test için hazırlanan Üre Agar besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi ortamının renginin sarıdan pembeye dönüşmesi, testin pozitif olduğunu göstermektedir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.5. Hidrojen Sülfid Üretimi**

Bu test için hazırlanan Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi ortamının renginin siyaha dönüşmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.6. İndol Testi**

Bu test için hazırlanan Tripton Broth besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmiş ve inkübasyon sonunda tüplerin içine 2 damla kovaks çözeltisi damlatılmıştır. Tüplerin içindeki besi ortamının üst yüzeyinde oluşan kırmızı renkli halka, indol üretiminin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.7. Metil Red Testi**

Bu test için hazırlanan MR-VP Broth besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmiş ve inkübasyon sonunda tüplerin içine 2 damla metil kırmızısı boyası damlatılmıştır. Tüplerin içindeki besi ortamının renginin kırmızıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.8. Voges Proskauer Testi**

Bu test için hazırlanan MR-VP Broth besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmiş ve inkübasyon sonunda tüplerin içine önce  $\alpha$ -naftol (%5) solüsyonu sonra

potasyum hidroksit (%16) solüsyonundan 5'er damla ilave edilmiştir. Tüpün dip kısmında kırmızımsı-kahverengi renk oluşumutestin pozitifolduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.3.9. Sitrat Testi**

Bu test için hazırlanan Simon Sitrat Agar besi ortamına, aktifleşen kültürden inoküle edilmişve inkübasyon sonunda besi ortamının renginin, yeşilden maviye dönüşmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir (Çotuk ve Sungur, 2014).

### **3.2.4. Moleküler Analiz**

#### **3.2.4.1. Total DNA İzolasyonu**

İzolatların total DNA ekstraksiyonu De Boer ve Ward (1995) metoduna göre yapılmıştır.

DNA ekstraksiyon basamakları sırasıyla;

-İzolatlar, TSB besi ortamında 1 gece aktifleştirilmiştir.

-Aktifleşen kültürden, 1 mL steril eppendorf aktarılmış ve 13.000rpm'de 20 dk. santrifüjlenmiştir.

-Santrifüjlenen tüpün üst kısmındaki sıvı kısım atılmış, dibe çöken kısım bırakılmıştır. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak için pelletin üzerine%1'lik SDS+TAEtamponundan 100µL eklenmiş ve vortekslenmiştir.

-Tüpler 50°C de 90 dk "hot plate" içerisinde bekletilmiştir. Süre sonunda amonyum asetat (7,5M) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır.

-Amonyum asetat içinde biriken hücre kalıntılarının altta toplanması için tüpler 13.000rpm'de 20 dk santrifüjedilmiştir. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmındaki sıvı, steril pipet ile temiz tüpe alınmıştır.

-Tüpe alınan DNA çözeltisi üzerine (yaklaşık 130µL) aynı miktarda derin dondurucudasogutulmuşolan isopropanol eklenmiştir.

-Tüpler, 13.000rpm'de 15dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak, dipte kalan kısım alınmıştır.

-100µL ependorf tüpleri içine soğutulmuş %70'lik etil alkol eklenmiştir. 10.000 rpmde 3dk. santrifüjedilerek etil alkol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüplerin kapağı açılarak, etil alkolün uzaklaşması sağlanmış ve tüpün kapağı kuruma işlemi gerçekleştirilmiştir.

-Kuruma işleminden sonra tüplere steril distile su (50µL) ilave edilmiş ve 37°C'de 60 dk bekletilmiştir.

-Ekstrakte edilen DNA, Nanodrop Spektrofotometrede (Thermo) ölçülerek, miktarı belirlenmiştir.

Yapılan işlem; belirli dalga boylarındaki ışığın, (örneğe göre değişen) örnek içinden geçirilmesi esasına dayanır ve ışığın örnek tarafından ne kadarının tutulduğunu belirler. Nükleik asitlerin ışığı en iyi absorbe ettiği dalga boyu 260/280 nm'dir. Spektrofotometrede yapılan ölçüm sonunda okunan değer 1.8-2.0 olmalıdır. Aksi durumda DNA'nın saflığından söz edilemez.

#### **3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile saflaştırılan DNA dizileri çoğaltılarak, birçok türün tanımlanması sağlanmaktadır (Järvinen ve ark., 2009). Bu yöntemde 27F ve 1492R olmak üzere 2 evrensel primer kullanılmıştır (Chen ve ark., 2015).

PCR’da kullanılan bileşenler ve PCR şartları şöyledir:

Çizelge 3.19. PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
H <sub>2</sub> O	14.1 µL
10X Taq buffer (GenMark)	2.5 µL (1X)
25 Mm MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL (2 Mm)
0.5 M Dntp karışımı	5 µL
2.5 Mm F primer	0.3 µL
2.5 Mm R primer	0.3 µL
DNA ürünü	1 µL (50 ng)
Taq polimeraz	0.3 µL (1U)

Çizelge 3.20. PCR şartları

3	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	45 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

PCR işlemi tamamlandıktan sonra 4 µL PCR ürünü üzerine 1 µL 6X yükleme boyası eklenmiş ve karıştırılmıştır. PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezine (%1) yüklenerek, görüntülenmiştir. Ayrıca DNA Marker (100 bç) yüklenmiştir.

16S rDNA gen dizisi, sınıflandırma hiyerarşisine yerleştirilmesi için GTCA Firması (Almanya) ’na gönderilerek, hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Sonuçlar, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> adresli nBLAST programı kullanılarak, GenBank verileri ile karşılaştırılmıştır.

### **3.3. Biyofilm Analizi**

#### **3.3.1. Kalitatif Analiz**

İzole edilen bakterilerin biyofilm oluşumlarının kalitatif analizi için Kongo Red Agarlı besi ortamına çizgi ekim yapılmıştır. Petriler, 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petrilerde siyah renkli koloniler biyofilm oluşumu pozitif, kırmızı kolonilerise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Melo ve ark., 2013).

#### **3.3.2. Kantitatif Analiz**

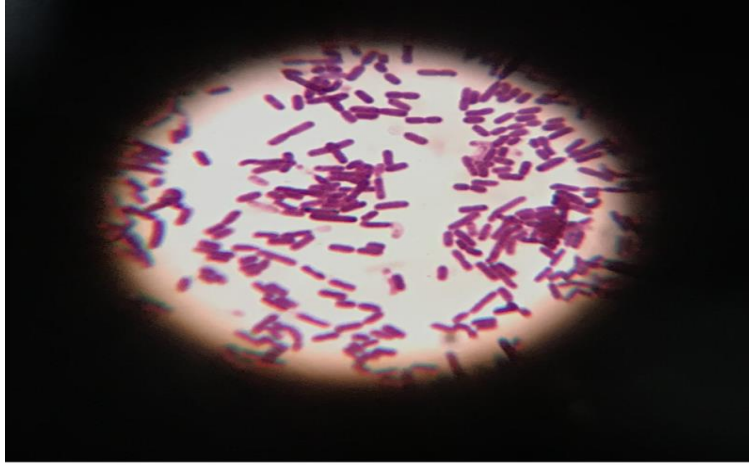
Kantitatif analiz mikroplak yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde steril 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Biyofilm oluşumu tespit edilen bakteriler TSB besi ortamında 1 gece aktifleştirilmiştir. Aktifleşen her bir örnekten Elisa Plate'e 150µL pipetlenmiş ve plaklar 37°C 'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Elisa Plate'deki örnekler dökülüp steril dH<sub>2</sub>O (distile su) ile 3 defa yıkanmış ve kurutulmuştur. Sonra üzerine 150µL kristal viyole boyası eklenerek, 45 dk bekletilmiş ve tekrar yıkanarak, kurutulmuştur. Daha sonra 200µL etil alkol/asetik asit (v/v) eklenerek, 10 dk bekletilmiştir. Kuyucuklar içerisindeki solüsyondan 100µL steril pipet ile temiz bir plak içine aktarılmış ve spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır (Stepanovic ve ark., 2007).



## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatların Morfolojileri

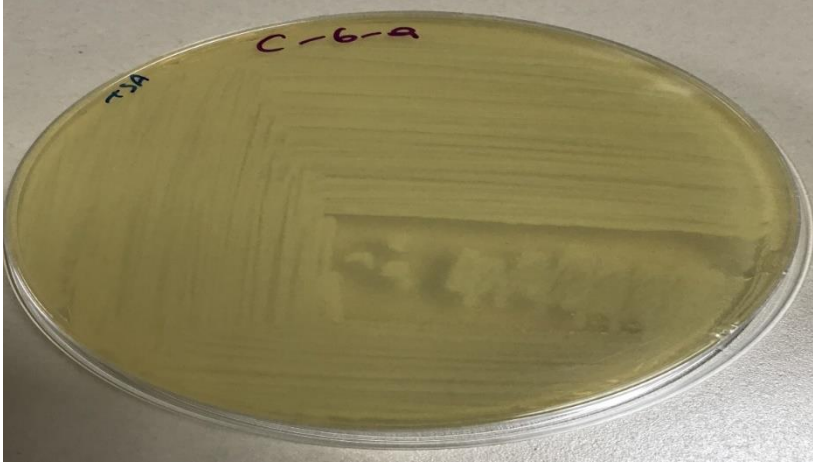
İzolatlara Gram boyama uygulandıktan sonra mikroskop altında yapılan inceleme sonunda kısa basil, uzun basil, kok, kokobasil morfolojilerine sahip hücre şekilleri ile mor ve pembe renkli hücreler görüntülenmiştir. Mor renkli olanlar Gram pozitif, pembe renkli olanlar Gram negatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar daha sonra moleküler tanımlamalar ile karşılaştırılarak uyumluluğu kontrol edilmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus cereus* 'un Gram boyama sonucunun mikroskopta incelenmesi.

## 4.2. Kültürel Özellikler

İzolatların kültürel özelliklerinde bazı kolonilerin yüzey yapılarının mat, yaygın, kenarları girintili çıkıntılı, kıvamlı ve şeffaf oldukları görülürken bazılarının parlak, kenarları düzgün, küçük, beyazımsı oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.2. TSA besiyortamında gelişen saf bakteri kültürü

## 4.3. Biyokimyasal Analiz

### 4.3.1. Analiz Sonuçları

***Escherichia coli***: Gram (-), Katalaz (+), H<sub>2</sub>S (-), Üreaz (-), MR (+), VP (-), İndol (+), Sitrat (-)

***Bacillus cereus***: Gram (+), Katalaz (+), Glukoz (+), Sukroz (+,-), Laktoz (-), İndol (-), MR (-), VP (+)

***Enterococcus faecalis***: Gram (+), Katalaz (-), Glukoz (+), Sukroz (+), Laktoz (+)

H<sub>2</sub>S (-), İndol (-), Sitrat (-), Üreaz (-), MR (-), VP (+)

***Proteus mirabilis***: Gram (-), H<sub>2</sub>S (+), İndol (-), Sitrat (+,-), Üreaz (+), MR (+), VP (-)

***Klebsiella pneumoniae***: Gram (-), Katalaz (+), Glukoz (+), Sukroz (+), Laktoz (+)

H<sub>2</sub>S (-), İndol (-), Sitrat (+), Üreaz (+), MR (-), VP (+)

***Citrobacter freundii***: Gram (-), Katalaz (+), H<sub>2</sub>S (+), İndol (-), Sitrat (+), Üreaz (+), MR (+), VP (-)

***Enterobacter ludwigi***: Gram (-), Katalaz (+), H<sub>2</sub>S (-), İndol (-), Sitrat (+), Üreaz (-), MR (-), VP (+)

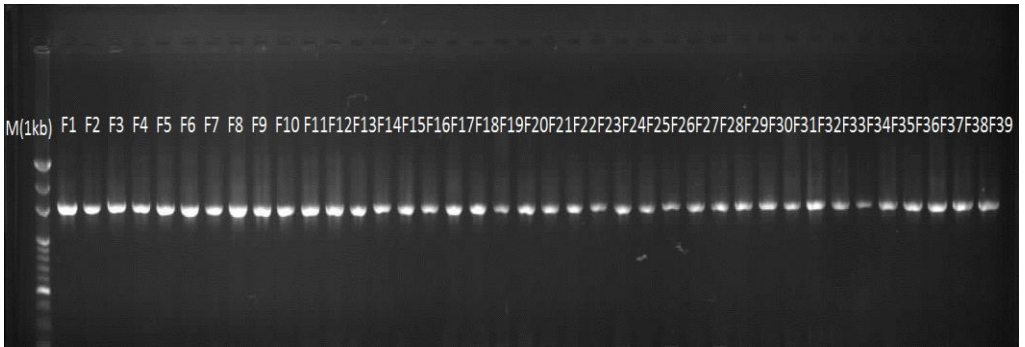
***Streptococcus gallolyticus***: Gram (+), Glukoz (+), Sukroz (+), Laktoz (+)

H<sub>2</sub>S (-), İndol (-), Sitrat (-), Üreaz (+), MR (-), VP (+),

#### 4.4. Moleküler Analiz

##### 4.4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

Moleküler tanılama için izole edile 80 bakteri kültüründen DNA izolasyonu yapılarak agaroz jel elektoroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İzole edilen bakteri DNA'larının jel elektoroforezinde görüntülenmesi (M:1kb DNA marker. Genmark)

Saflığı kontrol edilen DNA örneklerine PCR işlemi uygulanmıştır. 67 izolatin PCR amplikasyon ürünleri elektorofrez yöntemiyle görüntülenmiştir. DNA dizileme analizi için hizmet alımı şeklinde GTCA Firması 'na (Almanya) gönderilmiştir. 13 izolatin PCR ürünleri görüntülenemediği için çalışmadan çıkarılmıştır.

Analizi gerçekleştirilen DNA dizi sonuçları, nBLAST programı kullanılarak (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank'taki verilerle karşılaştırılmış ve moleküler tanılama yapılmıştır. Elde edilen bakteri türleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları

İzolat No	Örnek Alınan Yüzey	Bakterinin Adı	Accession No	Benzerlik (%)
1	Tavuk-döner	<i>Enterobacter ludwigiistrain D8</i>	MT374261.1	99
2	Tavuk-döner	<i>Enterobacter ludwigiistrain CEB04</i>	CP039741.1	99
3	Tavuk-döner	<i>Enterococcus faecalisstrain 2623</i>	MT611645.1	99
4	Tavuk-döner	<i>Enterococcus faecalisstrain 2623</i>	MT611645.1	99
5	Tavuk-döner	<i>Enterobacter ludwigiistrain KCOM 1206</i>	MT239508.1	100
6	Simit Tezgâhı	<i>Klebsiella pneumoniaestrain KP20194a</i>	CP054780.1	99
7	Simit Tezgâhı	<i>Klebsiella pneumoniaestrain sks1</i>	HM007813.1	99
8	Zeytinci Metal Kaşık	<i>Klebsiella pneumoniaestrain 7609</i>	MT516162.1	100
9	Simit Tezgâhı	<i>Klebsiella pneumoniaestrain KP20194a</i>	CP054780.1	100
10	Simit Tezgâhı	<i>Enterobacter asburie strain NPKC2</i>	MN691841.1	99
12	Simit Tezgâhı	<i>Bacillus cereus strain PJA1.5</i>	MT337533.1	99
13	Tavuk	<i>Proteus mirabilis strain MPE4069</i>	CP053718.1	99
14	Tavuk	<i>Enterococcus faecalis strain 2358</i>	MT604811.1	100
15	Tavuk	<i>Proteus mirabilis strain MPE4069</i>	CP053718.1	100

Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları (Devamı)

İzolat No	Örnek Alınan Yüzey	Bakterinin Adı	Accession No	Benzerlik (%)
16	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Kurthia gibsonii strain KH2</i>	MN453416.1	99
17	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Morganella morganii strain MP63</i>	CP048806.1	99
18	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Kurthia gibsonii strain KH2</i>	MN453416.1	99
19	Peynir Tezgahı	<i>Klebsiella pneumoniae strain WSHvKP</i>	CP054063.1	100
20	Peynir Tezgahı	<i>Klebsiella pneumoniae strain 7609</i>	MT516162.1	100
21	Peynir Tezgahı	<i>Escherichiacoli strain Y4-2</i>	MT192517.1	100
22	Tulum Peyniri	<i>Morganella morganii strain OF8</i>	MN547625.1	100
23	Peynir Cam Tezgahı	<i>Enterococcus faecalis strain 2358</i>	MT604811.1	99
24	Tulum Peyniri	<i>Morganella morganii strain RIM13</i>	MN158172.1	99
25	Tulum Peyniri	<i>Citrobacter freundii strain E2WCTM1</i>	MH985222.1	99
26	ZeytinciMetal Kaşık	<i>Bacillus amyloliquefaciens strain A13</i>	MT591294.1	99
27	Zeytinci Plastik Kap	<i>Bacillus velezensis strain KKLW</i>	CP054714.1	100
28	Zeytinci Plastik Kap	<i>Acinetobacter calcoaceticus strain CA32</i>	MT197389.1	100

Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları (Devamı)

İzolat No	Örnek Alınan Yüzey	Bakterinin Adı	Accession No	Benzerlik (%)
29	<b>Peynir Cam Tezgahı</b>	<i>Escherichiacolistrain N15-1</i>	MT192520.1	100
30	<b>Peynir Cam Tezgahı</b>	<i>Klebsiella pneumoniae strain 7609</i>	MT516162.1	99
31	<b>Midye Tezgahı</b>	<i>Enterobacter hormaechei RB18</i>	LC386024.1	100
32	<b>Döner Tezgahı</b>	<i>Bacilluslicheniformisstr ain VRKPCH23</i>	KJ958501.1	100
33	<b>Tavuk Tezgahı-2</b>	<i>Proteus mirabilisstrain HN2p</i>	CP046048.1	100
34	<b>Zeytin</b>	<i>Bacillus subtilis strain CFR08</i>	MT641227.1	100
35	<b>Zeytin</b>	<i>Acinetobacter schindleri strain RP1</i>	MG461636.1	98
36	<b>Kokoreç Tahta Kesim Yeri</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens strain BV2007</i>	MT613661.1	100
37	<b>Tostçu Plastik Tezgah</b>	<i>Klebsiella michiganensis strain F107</i>	CP024643.1	99
38	<b>Tostçu Plastik Tezgah</b>	<i>Klebsiella michiganensis strain W14</i>	MT572941.1	100
39	<b>Çiğ Köfteci Fayans Tezgah</b>	<i>Bacillus velezensis strain HSB1</i>	MT626060.1	100
40	<b>Midye Dış Kabuk</b>	<i>Bacillus velezensis strain HSB1</i>	MT626060.1	100
42	<b>Midye Dış Kabuk</b>	<i>Staphylococcus epidermidis strain3039</i>	MT613456.1	100

Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları (Devamı)

İzolat No	Örnek Alınan Yüze	Bakterinin Adı	Accession No	Benzerlik (%)
43	Midye Dış Kabuk	<i>Bacillus cereus</i> strain TBMAX51	MK834690.1	99
48	Tavuk Döner Tezgahı	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain D8	MT374261.1	100
49	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Bacillus subtilis</i> strain CFR07	MT641226.1	99
50	Et Döner Tezgahı	<i>Bacillus subtilis</i> strain DY10-1	KU862326.1	100
51	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Bacillus licheniformis</i> strain AG-RA	MG662177.1	100
52	Simit Tezgahı	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MS14393	CP054303.1	100
53	Et Döner Tezgahı	<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain TDGB428	JQ912071.1	99
55	Et Döner Tezgahı	<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain VTM4R20	KP009828.1	100
56	Tavuk Tezgahı Metal	<i>Morganella morganii</i> strain 17YB9	MN807694.1	100
57	Peynir Tezgahı	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain RHBSTW-00012	CP058191.1	100
60	Tulum Peyniri	<i>Escherichia coli</i> strain NF73	MT649856.1	100
62	Zeytinci Plastik Kap	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 7609	MT516162.1	99
64	Midye Tezgahı	<i>Escherichia coli</i> strain EcPF7	CP054232.1	100

Çizelge 4.1. Toplam 67 İzolatın Sekans Sonuçları (Devamı)

İzolat No	Örnek Alınan Yüze	Bakterinin Adı	Accession No	Benzerlik (%)
65	Balık Tezgahı	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain PS25	MT471003.1	99
66	Döner Tezgahı	<i>Enterococcus gallinarum</i> strain CCFM8325	KJ803882.1	99
67	Tavuk Tezgahı	<i>Proteus mirabilis</i> strain MPE0108	CP053614.1	100
68	Tavuk Tezgahı-2	<i>Proteus mirabilis</i> strain MPE5139	CP053684.1	99
69	Zeytin	<i>Bacillus subtilis</i> strain CFR08	MT641227.1	99
70	Peynir Tezgahı	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MLTBM2	MT646431.1	100
71	Tulumba Tatlısı	<i>Bacillus cereus</i> strain GD1	MT434695.1	100
72	Şambali Tatlısı	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU1957	MF424369.1	100
73	Şambali Tatlısı	<i>Staphylococcus warneri</i> strain DK131	MT642942.1	100
74	Tiriliçe Tatlısı	<i>Pantoea conspicua</i> strain B6	MF083088.1	100
75	Tostçu Tahta Tezgah	<i>Bacillus velezensis</i> strain DH8043	CP047268.1	100
78	Tostçu Tezgah	<i>Enterococcus faecium</i> strain 4525	MT545041.1	100
79	Midye Kabuk İçi	<i>Bacillus subtilis</i> strain HR-4	MT645613.1	100
80	Peynir Tezgahı	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 2484	MT634697.1	100

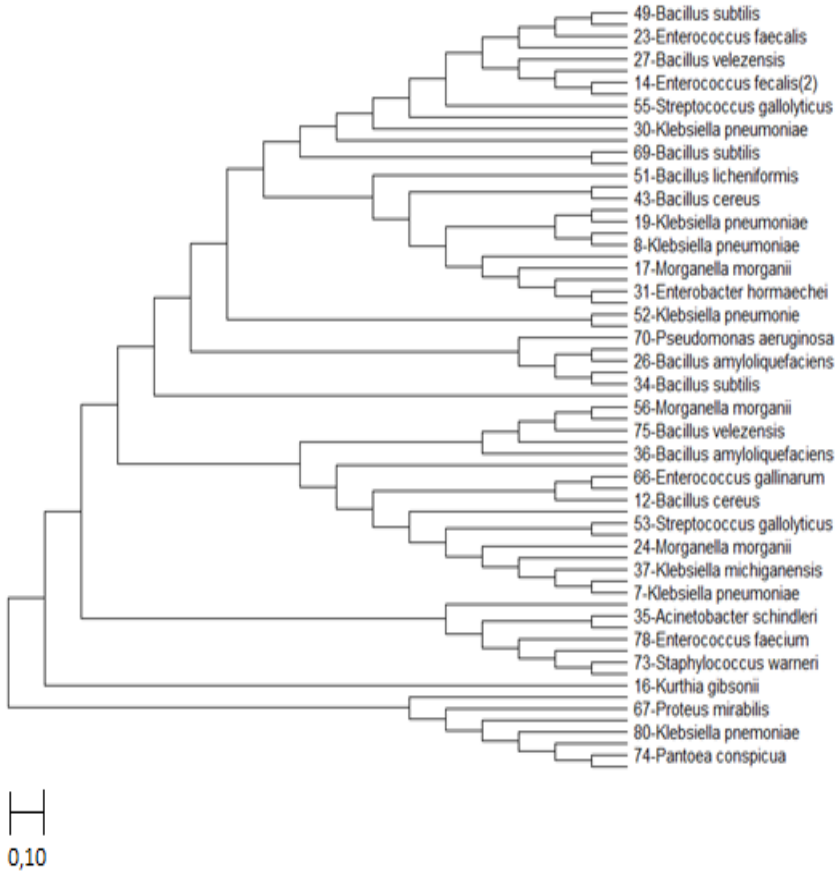


#### 4.4.2. Analizi Yapılan Modeller ve Filogenetik Ağaç Diyagramı

En düşük BIC (Bayes Bilgi Kriteri) skorundaki model en iyi ikame düzenine karşılık gelmektedir. Bu yüzden ağaç oluşumunda en düşük BIC skorlu model seçilir. Tüm modeller için AICc ve lnL değerleride verilmiştir (Nei ve Kumar, 2000). Evrimsel oranlar birliği olmadığı için 5 oranlı kategorilerle Gamma dağılımı kullanılarak modellenmiş ve bölgelerin belirli kısımları evrensel kabul edilmiştir. Çizelge 4.3’ de görüldüğü gibi en düşük BIC skorlu gamma dağılımına sahip Tamura -3 (TN93+G) modeli bulunmuştur. Şekil 4.4’ deki Maximum Likelihood ağacı bu model ile oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2. Test edilen model ve skor sonuçları (BIC: Bayesian Information Criterion, AICc: Akaike Information Criterion, corrected, lnL: Maximum Likelihood Value, G: Gamma Dağılımı, I: Evrimsel değişmez, GTR: General Time Reversible, HKY: Hasegawa-Kishina-Yano, TN93: Tamura-Nei, T92: Tamura3, K2: Kimura2, JC: Jukes-Cantor)

Model	Parameter	BIC	AICc	lnL
TN93+G	135	81298,77	80122,11	-39925,6
TN93	134	81299,32	80131,37	-39931,3
TN93+I	135	81302,93	80126,27	-39927,7
TN93+G+I	136	81305,83	80120,46	-39923,8
GTR	137	81308,3	80114,22	-39919,7
GTR+G	138	81308,4	80105,62	-39914,4
HKY+G	134	81308,77	80140,82	-39936
HKY	133	81314,71	80155,47	-39944,3
HKY+I	134	81315,09	80147,14	-39939,2
GTR+I	138	81316,58	80113,79	-39918,5
GTR+G+I	139	81317,51	80106,01	-39913,6
HKY+G+I	135	81318,03	80141,37	-39935,3
T92+G	132	81514,99	80364,47	-40049,8
T92	131	81517,2	80375,38	-40056,3
T92+I	132	81522,24	80371,72	-40053,5
T92+G+I	133	81525,13	80365,89	-40049,5
K2+G	131	81611,7	80469,88	-40103,6
K2	130	81614,91	80481,8	-40110,5
K2+I	131	81621,49	80479,67	-40108,5
K2+G+I	132	81622,19	80471,66	-40103,4
JC+G	130	81656,04	80522,93	-40131,1
JC	129	81662,8	80538,4	-40139,8
JC+G+I	131	81667,86	80526,04	-40131,6
JC+I	130	81668,73	80535,62	-40137,4



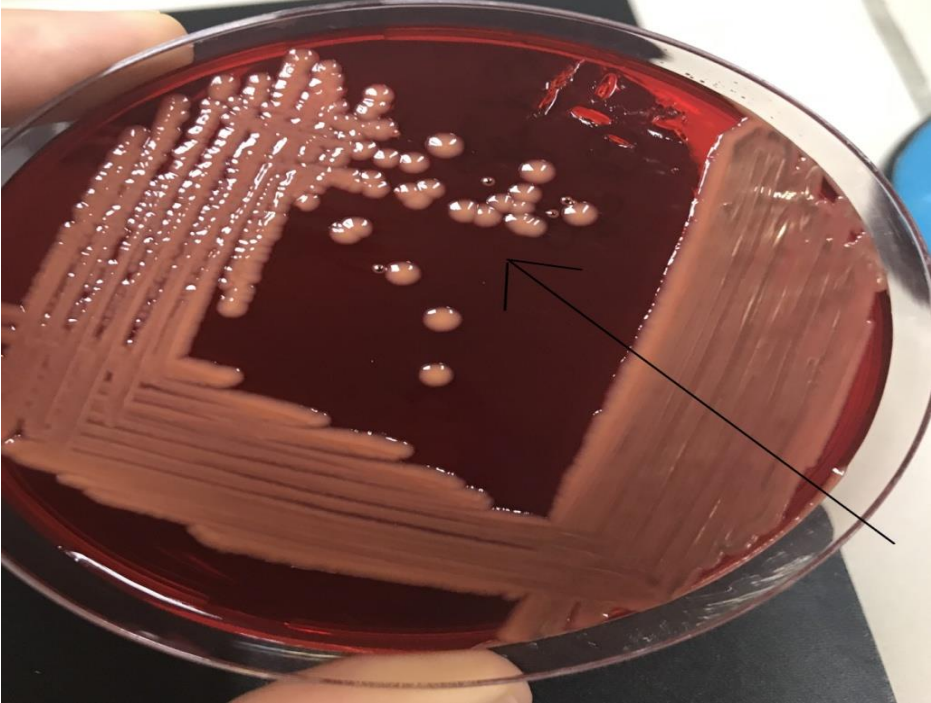
Şekil.4.4. Maximum likelihood yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaç (İlişkili taksonlarının bir araya getirildiği ağaçların yüzdesi bootstrap (1000 tekrarlı) testi kullanılarak belirlenmiş ve dalların yanında belirtilmiştir).

Evrimsel tarih Tamura-3 parametresi modeli ile Maximum likelihood yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bölgeler arasındaki evrimsel oran farklılığını modellemek amacıyla Gamma dağılımı (G+ parametre 1) kullanılmıştır.

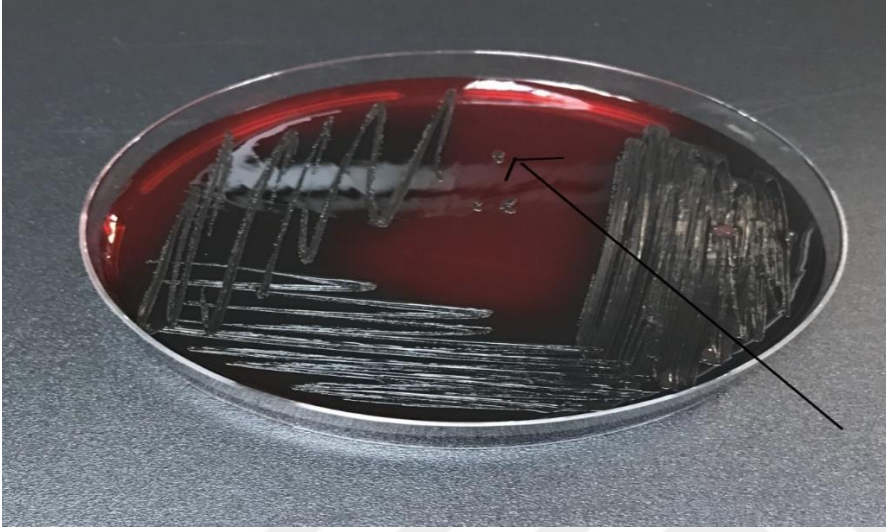
## 4.5. Biyofilm Analizi

### 4.5.1. Kalitatif Analiz

Biyofilm oluşunun kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla kullanılan CRA yonteminde, siyah renkli koloniler biyofilm pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir.



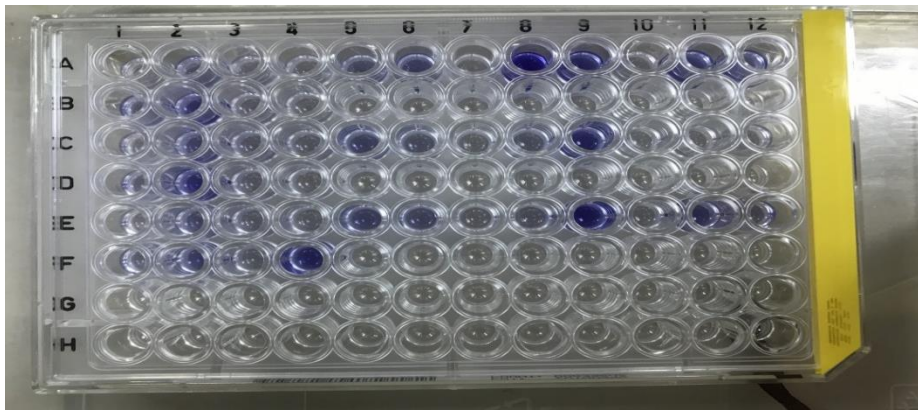
şekil 4.5. Biyofilm oluşunun kalitatif yonden negatif sonuç örneği (*Klebsiella pneumoniae*)



Şekil 4.6. Biyofilm oluşumunun kalitatif yönden pozitif sonuç örneği (*Enterococcus faecium*)

#### 4.5.2. Kantitatif Analiz

Biyofilm oluşumunu kantitatif yönden belirlenmesi amacıyla kullanılan mikroplak yönteminde bulunan sonuçlar Çizelge 4.3' de verilmiştir. Tablodaki optik dansite değeri 0,240'tan büyük olan suş kuvvetli adheran, 0,120-0,240 olan suş adheran, 0,120 ve altında olan suş ise adheran negatif olarak belirlenmiştir (Keskin ve ark. 2017).



Şekil 4.7. Biyofilm oluşumunun kantitatif yönden değerlendirilmesinde kullanılan 96 kuyucuklu Elisa-Plate

Çizelge 4.3. Spektrofotometrede ölçüm sonuçları (Besi ortamı: Negatif Kontrol, *Staphylococcus aureus*: Pozitif Kontrol)

<b>Bakteri</b>	<b>Optik Dansite Değeri</b>	<b>Besiortamı</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>Değerlendirme</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> strain 2623	0,612	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Bacillus cereus</i> strain PJA1.5	0,32	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Citrobacter freundii</i> strain E2WCTM1	0,282	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 3039	0,287	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Bacillus cereus</i> strain TBMAX51	0,935	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Enterococcus gallinarum</i> strain CCFM8325	0,142	0,065	0,086	<b>Adheran</b>
<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU1957	0,176	0,065	0,086	<b>Adheran</b>
<i>Pantoea conspicua</i> strain B6	0,293	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>
<i>Enterococcus faecium</i> strain 4525	0,384	0,065	0,086	<b>Kuvvetli Adheran</b>

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında Aydın ilinde açıkta satışı yapılan peynir, zeytin, tavuk, simit, tatlı, çiğ köfte, balık, midye, tost, et-tavuk döner satış tezgâhları, gıda yüzeyleri ile gıdaya temas eden metal ve cam yüzeylerden örnekler alınarak, bakterilerin tanınması ve biyofilm oluşturma kabiliyetleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada toplam 80 izolat elde edilmiş ve saflaştırılmıştır. Tüm izolatların DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve PCR amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir. PCR amplifikasyon ürünlerinden 67 izolatın elektroforez yönteminde görüntülenmesi sağlanmıştır. Fakat 13 izolat görüntülenemediği için çalışmadan çıkarılmıştır.

Sekans analizi sonucunda toplamda 15 farklı cinsten 67 bakteri türü elde edilmiştir. Tanılanan bakteri türleri arasından; *Enterococcus faecalis* strain 2623, *Bacillus cereus* strain PJA1.5, *Citrobacter freundii* strain E2WCTM1, *Staphylococcus epidermidis* strain 3039, *Bacillus cereus* strain TBMAX51, *Enterococcus gallinarum* strain CCFM8325, *Enterococcus faecium* strain CAU1957, *Pantoea conspicua* strain B6, *Enterococcus faecium* strain 4525 bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır.

Yanık, (2020), yaptığı çalışmada, Ankara ilinde bulunan bir et işletmesinin gıda ile temas eden çeşitli yüzeylerinden alınan örneklerde *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus warneri*, *Escherichia coli* türlerinin olduğu 20 adet mikroorganizma tanımlanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada aynı yöntem ile (16S rRNA) aynı türler farklı yüzeylerden izole edilmiştir. *Escherichia coli* peynir tezgahında ve midye yüzeyinden, *Staphylococcus warneri* şambali, *Acinetobacter* spp.'nin farklı türü olan *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter schindlerii* zeytin yüzeyinden tanımlanmıştır.

Abebe (2020), mikrobiyal bağlanmada, gıda temas yüzeyi önemli olduğundan bağlanmayı azaltmak için uygun teknolojiyle temizlemeye elverişli malzemeler tasarlanmanın biyofilm ile mücadelede daha etkili olduğunu belirtmiştir. Biyofilm oluşumunda diğer kritik konun, sinyal molekülleri ile bakteriler arasındaki iletişim olduğunu düşünmüş ve mücadelede bu iletişim mekanizmasının engellenebileceğini tespit etmiştir. Bu şekilde antibiyotiklerin biyofilm

engellenmesinde etkili olmadığı durumlarda, öngörülen yöntem ile biyofilm kaynaklı kronik enfeksiyonların önlenebileceği saptanmıştır.

Lo ve ark (2019), Hong Kong'da et satışı yapılan pazar yerlerinde kullanılan 9 adet ıslak ahşap kesme tahtası yüzeyinden numuneler almışlar ve çok sayıda çeşitli suş izole edip tanımlamışlardır. Ayrıca yapılan çalışmada kesme tahtalarının geleneksel bir temizleme tekniği olarak yüzeyini kazımanın verimliliği de araştırılmıştır. Çalışma sonunda kesme tahtalarında çoğunlukla *Klebsiella pneumoniae* olduğu tespit edilmiş ve geleneksel temizleme yönteminin hijyen olarak yetersizliği anlaşılmıştır. Kesme tahtaları arasındaki kısımlarda ise en fazla *Enterobacteriaceae*, *Escherichia* ve *Shigella* spp. ye rastlanmıştır (Moremi ve ark., 2016).

Kazıma ile temizliğin etkili olmamasında yüzeydeki patojenin kesme aleti ile açılan yeni zemine bulaştığı düşünülmektedir. Kesme tahtasının iç katmanlarında biyo-film varlığı, gömülü organizmaları kesme tahtalarının geleneksel temizliği sırasında "kazınmaya" karşı korumanın yanı sıra sanitasyon maddelerine karşı bir kalkan sağlayabilir. Kesme tahtaları gibi yüzeylerdeki kötü hijyenin, potansiyel olarak istenmeyen organizmaların çoğalmasında ve biyofilm oluşumunda etkisi olduğu belirtilmiştir. (Anonymous, 2018).

Biyofilmlerin varlığı aynı zamanda yatay gen transferi riskini de artırabilir (Hausner ve Wuertz, 1999; Sorensen ve ark., 2005). Kesme tahtalarında teşhis edilen patojen cinslerin varlığı endişe verici bir bulgu olup, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından sorgulaması gerekmektedir.

Yaptığımız çalışmada tavuk döner, et döner, tavuk, peynir, tost satışı yapılan tezgahlarda kesme tahtasının sıklıkla kullanıldığı görülmüş ve alınan örneklerden *Kurthia gibson*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* bakterileri izole edilmiştir. Zhao ve ark. (2017), bazı mikroorganizma metabolitlerinin, ortamdaki biofilm oluşumunu ve gelişimini önleyebileceğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* tarafından üretilen sürfaktinin bileşiğinin, *Salmonella enterica* ve *Escherichia. coli*' nin biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Biyofilmlerin rekabet, dışlama ve yer değiştirme aktiviteleri ile gıda kaynaklı patojenik biyofilmlerin oluşumunun olumsuz etkilenebileceği bulunmuştur. Biyofilmlerde gözlemlenen bu yeni tespitler ile mücadelede geleneksel kontrol

stratejilerinden başka daha kombine ve etkili yöntemlerin geliştirilmesinin mümkün olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda örnek alınan yüzeylerde tek bir kültüre rastlanmamış, mikroorganizmaların topluluk halinde yaşadığı görülmüştür. Bu sebep ile izole ettiğimiz *Escherichia coli*'nin biyofilm oluşumunun negatif olması ortamdaki diğer bakterilerin ürettiği bileşiklerden kaynaklanmış olabilir.

Boye ve ark. (2015), Gana'nın Orta Bölgesi'ndeki Cape Coast Üniversitesi kampüsündeki ve çevre köylerdeki yiyecek otomatlarından ve satış tezgahlarından gelen tabak veya servis kaşığı gibi servis araçlarının patojen mikrobiyolojik yükünü araştırmışlardır. Yiyecek satış noktaları steril edildikten sonra servis kaplarından toplam 120 sürüntü örneği alınmış ve *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, koagülaz negatif *Staphylococci*, *Proteus mirabilis* ve *Micrococcus spp.* Bakteri türleri izole edilmiştir. Bu izolatların %21 *Bacillus cereus* olarak belirlenmiştir. Servis kaplarındaki mikrobiyal yükün fazlalığının, satıcılardan kaynaklanmayan hijyen kurallarına önem verilmemesi olduğu tespit edilmiştir. Birçok satıcının, tüm kullanılmış servis kaselerini, sabunlu su bulunan bir kaptaki temizleyip, hiç değiştirilmeyen su dolu başka bir kaptaki yıkadıkları görülmüştür. Kirli durulama suyunun, belki de bir rezervuar veya çapraz kontaminasyon için bir "aşılama" görevi gördüğü düşünülmektedir. Servis kaplarından en baskın bakteri izolatının *Bacillus cereus* olması ciddi bir endişe kaynağını oluşturmuştur. Çünkü *Bacillus cereus*, gıda kaynaklı hastalıkların kaynağıdır (Butler ve ark., 2015; Jessberger ve ark., 2015; Andersson ve ark., 1995; Murindamombe ve ark., 2005).

Yaptığımız çalışmada toplanan örneklerin büyük kısmı pazar yeri, sokak tezgahları gibi dezenfeksiyonun iyi yapılmadığı yerlerden alınmıştır. Sonuçların önceki yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter harmaechei*, *Proteus mirabilis* türleri tespit edilmiştir.

Trachoo (2003), biyofilmin mikro yapıları, büyüme modunun avantajlarını, antimikrobiyal ajanlardan koruma stratejilerini, plazmid transferini epifloresan mikroskopu ve CSLM kullanılarak, bilgisayar yazılımı yardımıyla



incelenebileceğini göstermiştir. Bu yöntem ile gıdalar, gıda temasları ve çevresel yüzeyler üzerindeki biyofilm patojenlerinin nasıl hayatta kaldığını anlayarak, mücadelede daha başarılı olunabileceğini tespit etmiştir.

Gelinas ve ark. (1984), yaptıkları çalışmada klorun, organik materyal tarafından kolayca inaktive edildiğini ve bu nedenle biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltabildiğini belirtmişlerdir.

Yanıkan (2020), karvakrol, timol, öjenol ve vanilin olmak üzere, 4 adet uçucu yağ bileşenleri ile (UYB) antibiyofilm etkisi araştırılmıştır ve etkili olduğu görülmüştür.

Ayhan (2016), süt işletmelerinde paslanmaz çelik yüzeyinde temizlik, dezenfeksiyon işlemi uygulamasından sonra test yüzeyinde sadece bakteri hücre tutunmasının gerçekleştiği, biyofilm oluşumunun gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır. Yüzeye tutunmuş bakteri hücrelerinin yüzeyden tümüyle uzaklaştırılmasında temizlik, dezenfeksiyon işleminde kullanılan etken maddelerin ve yüzey yapısının büyük bir etkisi olduğu belirtmiştir.

Yaptığımız çalışmada peynirden alınan örneklerde mikroorganizma gelişiminin olduğu görülmüş hatta biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi hijyen ve sanitasyon eksikliği olarak düşünülebilir.

Nahar ve ark. (2018), biyofilm oluşumunun önlenmesi için enzim aktivitesinin etkili olduğu sonucuna ulaşmıştır. Bu yöntemin geleneksel temizlik maddeleri ve antibiyotiklere alternatif bir çözüm olabileceği ön görülmüştür. Çevreye zarar vermeden gıda zehirlenmesi ve gıda bozulmalarının; sağlık ve gıda alanlarında oluşturduğu tehlikenin düşürülebileceği tespit edilmiştir. Lipaz enzim aktivitesinin *Bacillus cereus*'un biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. Bu çalışma ile uyumlu olarak, yaptığımız çalışmada simit tezgahı ve midye dış kabuğundan alınan örneklerde *Bacillus cereus* 'un biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Biyofilm ile mücadelede bu yöntemin etkili olabileceği düşünülmektedir.

Nadarasah (2012), *Pantoea conspicua* 'nın da içinde olduğu *Pantoea* tür gruplarının suşlarının benzer olduğu görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada triliçe tatlısı yüzeyinde *Pantoea conspicua* türünün biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmanın yüzeyde tespit edilmesinde insan kaynaklı bir bulaşma ya da hijyen eksikliğinden kaynaklı bir sorun olduğu düşünülmektedir.

Bakteriyel biyofilmler doğada her yerde bulunduğu gibi gıda endüstrisinde de karşımıza çıkmakta, hatta gıda sektöründe ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Gıda işleme ekipmanında ve gıdayla temas eden yüzeylerde oluşan biyofilmler, gıda ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini ve güvenliğini tehdit eden kalıcı bir kontaminasyon kaynağıdır. Gıda kaynaklı hastalıklara ve ekonomik kayıplara neden olur. Biyofilmin önlenmesi ve kontrolü bu nedenle gıda endüstrisinde bir önceliktir ve bu endüstri aşağıda belirtilen konular üzerinde teşvik edilmelidir:

- Biyofilm oluşumunun önlenmesi ya da yok edilebilmesi için temizlik ve dezenfeksiyona önem verilmeli, üretici bilinçlendirilmeli, denetimler sıklaştırılmalıdır.
- Gıdayla temas eden malzemeler, ekipman ve aletler biyofilm oluşumunu engelleyici tasarıma sahip olmalıdır.
- Üretim sürecinde biyofilm eğilimli alanlar belirlenip bu alanlardaki mikrobiyal yük sistematik olarak denetlenmelidir.
- Temizlik maddelerinin ve dezenfektanların etkinliği, bağlanma ve biyofilm oluşumunda rol oynayan faktörlerdir. Bakterilerin direnç geliştiremeyeceği, çevre ve insan sağlığına zarar vermeyecek dezenfektanlar ile yeni biyofilm oluşumunu önleme veya kontrol stratejileri geliştirme üzerine araştırmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Ababe, G. 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. **International Journal of Microbiology**, 2020: 1- 10.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N-E. 2014. **Archives Microbiology**, 196: 453- 472.
- Abdalla, M.A., Siham, E.S., Alian, Y.Y.H.A., Amel, O.B. 2008. A study of the microbial content of the domestic refrigerators in Khartoum area. **The Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry**, 47: 15-23.
- Abraham, V.J., Rao, A.T., Dhana, R.R., Dhananjaya, E.N.R. 2018. Electron micro-probe mineral chemistry and dating of monazite from the cordierite-gneisses near vizianagaram in the eastern ghat granulite belt, India. **Journal of Applied Geochemistry**, 20: 181-191.
- Akan, E., Kınık, Ö. 2014. Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. **Gıda ve Yem Bilimi- Teknolojisi Dergisi**, 14: 42- 51.
- Allison, D.G.2003. The biyofilm matrix. **Biofouling**, 19: 139-150.
- Altun, H.U., Şener, B. 2008. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. **Hacettepe Tıp Dergisi**, 39: 82- 8.
- Andersson, A., Ronner, U., Granum. P.E. 1995. “What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?” **International journal of food microbiology**, 28 :145- 155.
- Anonim. 1997. Codex Alimentarius Food Hygiene Texts, Joint FAO/WHO Food Standart Programme, Rome.
- Anonymous, 2018. Food Hygiene Code. Available at: [https://www.fehd.gov.hk/english/publications/code/allc\\_2.html](https://www.fehd.gov.hk/english/publications/code/allc_2.html) (accessed September 20).

- Araujo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Edited by A. Mendez Vilas, Formatex Research Center, Badajoz.
- Artık, N., Şanlıer, N., Sezgin, A.C., 2019. Gıda Güvenliği ve Gıda Mevzuatı. Detay Yayıncılık. 568s, Ankara.
- Arslan, S. 2009. Çürük Gelişimi Üzerine Türk Propolisinin İnvitro ve İnvivo Etkisinin İncelenmesi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 67s, Kayseri.
- Ayhan, D. 2016. Süt İşletmelerinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 278 s, Ankara.
- Bai, A., Rai, R. 2011. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 10: 184-194.
- Başaran, B. 2016. ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi. **Journal of Food and Health Science**, 2: 9- 26.
- Bergey, D.H., Stamey, A.T., Holt, G.J., Holt, G.J., Pfennig, N., Bryant, P.M. 2015. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Wiley, 2083p, USA.
- Boye, A., Hope, A., Dwomoh, F. 2015. Transmission of Foodborne Illnesses: The Role of Serving Utensil- Dependent Transmission of Enteric Pathogens from Street- Food Vending Outlets at the University of Cape Coast Community in Ghana. **Nutriton Research Article**, 2: 386- 395.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Brissonnet, F.D. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, 27: 1017- 1032.
- Bridier, A., Vizuete, P.S., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naitali, M., Briandet, R. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, 45: 167-178.

- Butler, A.J., Thomas, M.K., Pintar, D.M.K. 2015. Expert elicitation as a means to attribute 28 enteric pathogens to foodborne, waterborne, animal contact, and person-to-person transmission routes in Canada. **Food Borne Pathogens and Disease**, 12: 335-344.
- Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., Liu, X., Zheng, W., Zheng, Z., Wang, H. 2020. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. **Microbiology Open**, 9: 1-11.
- Chen, Y., Lee, C., Lin, Y., Yin, K., Ho, C., Liu, T. 2015. Obtaining long 16S Rdna sequence su sing multiple primers and its application on dioxin-containing samples. **BMC Bioinformatics**, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. 1978. How bacteria stick. **Scientific American**, 238: 86- 93.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R.H.M., Lappin-Scott. H. 1995. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, 49: 711-45.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, 284:1318-22.
- Çiftçi, Z. 2005. Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.
- Çonker, S. 2019. Bazı Bakteriyel İletişim İnhibitörlerinin *Pseudomonas aeruginosa* da Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Belirlenmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49s, İstanbul.
- Çotuk, A., Sungur E.İ. 2014. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Yayınları, 174 s, Ankara.

- Davey, M.E., O'toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64: 847-67.
- De Boer, S.H., Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroceptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, 85: 854- 858.
- Demirağ, K., Yılmaz, H. 2009. Gıda Güvenliği, Sürdürülebilirliği ve Yerel Yönetimler. **TMMOB İzmir Kent Sempozyumu**, 647-656, İzmir.
- Dong, Y.H., Zhang, L.H., 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. **Journal of Microbiology**, 43: 101- 9.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms Review. **Clinical Microbiology**, 15: 167-93.
- Douglas, L., J. 2003. *Candida* Biofilms and Their Role in Infection. **Trends Microbiology**, 11: 30-36.
- Fenton, M., Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R., O'Mahony, J., Coffey, A. 2013. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP<sub>K</sub> Eliminates and Prevents Staphylococcal Biofilms. **International Journal of Microbiology**, 2013: 1-8.
- Fleming, D., Rumbaugh, K.P. 2017. Approaches to dispersing medical biofilms. **Microorganisms**, 5: E15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>.
- Foley, I., Marsh, P., Wellington, E.M.H., Smith, A.W., Brown, M.R. 1999. General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: A possible role in chronicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49:164-5.
- Fuerst, R. 1983. Sanitation in Food Handling. Fifte-enth Edition. W.B. Saunders Company, pp. 576, Philadelphia.
- Gelinas, L., Trudel, P., Hubert, C. 1984. Chimicostratigraphie et tectonique du Groupe de Blake River. **Ministère de l'Énergie et Des Ressources**, MM 83-01, 41 pages, Québec.

- Grupta, 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- 15.
- Güler, B., Uraz, A., Yalım, M. 2013. Peri-implant Hastalıkların Cerrahi Tedavisinde İmplant Yüzeylerine Uygulanan Dekontaminasyon Yöntemleri. **ADO Klinik Bilimler Dergisi**, 7: 1517- 1526.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2014. Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing), U. Ü. **Ziraat Fakültesi Dergisi**, 28: 83-92
- Hamıdı, S. 2015. Bazı Sentetik Kimyasal Maddelerin ve Doğal Ekstraktların Antimikrobiyal ve Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Hausner, M., Wuertz, S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 3710–3713.
- Hood, S., Zottola, E. A. 1995. Biofilms in food processing. **Food Control**, 6: 9–18.
- Järvinen, A., Laakso, S., Piiparinen, P., Aittakorpi, A., Lindfors, M., Huopaniemi, L., Piiparinen, H., Mäki, M. 2009. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. **BMC Microbiology**, 9: 1-16.
- Jayaraman, A., Wood, T.K. 2008. Bacterial Quorum Sensing: Signals, circuits and implications for biofilms and disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 10: 145-67.
- Jenkinson, F., Lapin-Scott, H.M. 2000. Biofilms adhere to stay. **Trends Microbiology**, 9: 9-10.

- Jessberger, N., Krey, M.V., Rademacher, C., Böhm, E.M., Katrin Mohr, A., Schulz, E.M., Scherer, S., Märtlbauer, E. 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, 6: 1-15.
- Karaca, B. 2011. Türkiye’den İzole Edilen *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 119s, Ankara.
- Karaman, A. 2019. Tavuk Örneklerinden İzole Edilen *Arcobacter* Türlerinde Sıtölethal Distending Toxin (CDT) Varlığının Araştırılması. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 68s, Kütahya.
- Karamaou, M., Tzetis, M., Rebelakou, P.E. 2010. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. **Revista Argentina de Microbiologia**, 42: 311-314.
- Kaya, İ., B., Yardımcı, H. 2014. Quorum Sensing. **Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**, 25: 25-31.
- Kayaardı, S. 2005. Gıda Hijyeni ve Sanitasyon. Sidas yayıncılık, 252 s, İzmir.
- Keskin, M., Setlek, P., Demir, S. 2017. Use of Color Measurement Systems in Food Science and Agriculture. International Advanced Researches & Engineering Congress, Osmaniye.
- Khelissa, S.O., Abdallah, M., Jama, C., Faille, C., Chihib, N.E. 2017. Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. **Journal of Material Environmental Science**, 8: 3326–3346.
- Kırmusaoğlu, S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. **The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents**. DOI:[Mhttp://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84411](http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84411).



- Koç, G., Erginkaya, Z. 2020. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antilisterial ve Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi. **Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 39: 60-67.
- Koçakoğlu, S. 2018. Biyofilm Üreten *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Biyofilm Üretme Kapasitelerinin Farklı pH, Sıcaklık ve Tuz Konsantrasyonunda İncelenmesi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s, Bursa.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N. 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *Plantarum* JCM 1149. **Food Microbiology**, 26: 592-597.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal Food Microbiol**, 42: 9–27
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross contamination to foods. **International Journal Food Microbiology**, 85: 227-36.
- Ling, N., Forsythe, S., Wua, Q., Ding, Y., Zhang, J., Zeng, H. 2020. Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. **Engineering**, 6: 393- 405
- Lasa, I., Penadés, J.R. 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, 157: 99- 107.
- Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B. 2000. Use of ELLSA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1851-6.
- Lindsay, D., Von Holy, A. 2006. Bacterial Biofilms Within The Clinical Setting: What Healthcare Professionals Should Know. **Journal of Hospital Infection**, 64: 313-25.

- Ling, N., Forsythe, S., Wua, Q., Ding, Y., Zhang, J., Zeng, H. 2020. Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. **Engineering**, 6: 393–405.
- Lo, M., Ngan, W., Tsun, S., Hsing, H., Lau, K., Hung, H., Chan, S., Lai, Y., Yao, Y., Pu, Y., Habimana, O. 2019. A Field Study Into Hong Kong's Wet Markets: Raised Questions Into the Hygienic Maintenance of Meat Contact Surfaces and the Dissemination of Microorganisms Associated With Nosocomial Infections. **Frontiers in Microbiology**, 10: 1-11.
- Losasso, C., Cibir, V., Cappa, V., Roccatò, A., Vanzo, A., Andrighetto, I. 2012. Food safety and nutrition: Improving consumer behaviour. **Food Control**, 26: 252-258.
- Madenci, A. B., Türker, S., Bayramoğlu, Z., Eyiz, V. 2019. Tüketicilerin Gıda Güvenliğine Yönelik Tutum ve Algılarını Etkileyen Sosyoekonomik Faktörler: Konya İli Örneği. **Helal ve Etik Araştırma Dergisi**, 1: 48-59.
- Madsen, J., Burmølle, M., Hansen, L., Sørensen, S. 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 65: 183–195.
- Mah, T.F.C., O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, 9: 34-9.
- Marcinkiewicz, J., Strus, M., Pasich, E. 2013. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, 123: 309-13.
- Melo, P., Ferreira, L., Filho, Zafalon, L., Vicente, H., Souza, V. 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44: 119- 124.
- Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 51: 249-253.

- Moremi, N., Claus, H., Mshana, S. E. 2016. Antimicrobial resistance pattern: a report of microbiological cultures at a tertiary hospital in Tanzania. **BMC Infectious Diseases**, 16: 2-7.
- Murindamombe, G.Y., Collison, K.E., Mpuchane, S., Gashe, A.B. 2005. "Presence of *Bacillus cereus* in street foods in Gaborone, Botswana". **Journal of Food Protection**, 68: 342-346.
- Nadarasah, G. 2012. Phylogenetic Analysis and Characterization of Plant, Environmental, and Clinical Strains of *Pantoea*. University of Regina Faculty of Graduate Studies and Research, Master of Science, 172, Saskatchewan.
- Nahar, S., Mizan M., Ha, A. 2018. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17: 1484-1502.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. **Journal of Bacteriology**, 104: 313-322.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, 348 pages, New York.
- Noronha, F., Silva, S.A., Mena, C., Almeida, G., Hogg, T., Gibbs, P. 2006. Food safety in the domestic environment: Kitchen Hygiene. **Journal of Food Technology**, 4: 264-267.
- Oliveira, N., Garcia, E., Xavier, J., Durham, W., Kolter, R., Kim, W., Foster, K. 2015. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. **Plos Biology**, 9: 1- 23.
- Özkaya, F.D., Cömert, M. 2008. Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi**, 65: 149- 158.

- Padera, R.F. 2006. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. **Cardiovascular Pathology**, 15: 264- 270.
- Panghal, A., Chhikara, N., Sindhu, N., Jaglan, S. 2018. Role of Food Safety Management Systems in Safe Food Production. **Journal of Food Safety**, 38: 1- 11.
- Perez-Rodriguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G.D., Valero, A., Carrasco, E., Garcia-Gimeno, R.M., Zurera, G. 2010. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and hand-ling at retail. **Meat Science**, 86: 479-85.
- Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing. **Wiss u-Technologie**, 32: 321-326.
- Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S., Song, H. 2016. Relation ship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistancein *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, 7: 1- 10.
- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., Daudé, D. 2018. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. **Frontiers in Pharmacology**, 9: 1-17.
- Rolland, S.L., McCabe, J.F., Robinson, C., Walls, A.W. 2006. In vitro biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives. **European Journal of Oral Sciences**, 114: 243-9.
- Rosan, B., Lamont, R.J. 2000. Dental plaque formation. **Microbes and Infection**, 2: 1599-607.
- Rudney, J.D. 2000. Saliva and dental plaque. **Advances in Dental Research**, 14: 29-39.
- Sakarya, S. 2005. Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans vetedavisindeki rolü. Klimik XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve infeksiyon Hastalıkları Kongresi: 3-8.

- Savage, V.J., Chopra, I., O'Neill, A.J. 2013. Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 57: 1968-70.
- Shu, M., Wong, L., Miller, J.H., Sissons, C.H. 2000. Development of multi-speciesconsortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. **Archives of Oral Biology**, 45: 27-40.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, 43:573–583.
- Sorensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., and Wuertz, S. 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nature Reviews Microbiology**, 3: 700–710.
- Speranza, B., Liso A., Russo, V., Corbo, M. 2020. Evaluation of the Potential of Biofilm Formation of Bifidobacterium longum subsp. Infantis and Lactobacillus reuteri as Competitive Biocontrol Agents Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria. **Microorganisms**, 8: 2-14.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukić, S., Čirković, I., Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiterplates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, 115: 891–899.
- Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J., Fuqua, C. 1998. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 3486-90.
- Şar, T., Akbaş, M. 2018. Control of B. Cereus Biofilms by Citric Acid Treatments. **The Journal of Food**, 43: 605-616.
- Şimşek, M. 2014. Nanofiber-Desenli Polimerik Membranlar: Yüzey Kimyası, Topografisi ve Hücresel Etkileşimler. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 185s, Ankara.

- Tayar, M., Yıbar, A. 2013. Et Muayenesi. Dora Basım-Yayın Dağıtım, 348s, Bursa.
- Ten, Cate, J.M. 2006. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, 94: 1-9.
- Thomas, J.G., Nakaishi, L.A. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. **JADA**, 137: 10-5.
- Thurnheer, T., Ploeg, J.R., Giertsen, E., Guggenheim, B. 2006. Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. **Caries Research**, 40: 163–71.
- Todd, E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, C.A., Michaels, B.S. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of food-borne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protect**, 70: 2199-217.
- Tormo, M.A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., Penade's, J.R., 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer. **Microbiology**, 151: 2465-2475.
- Trachoo, N. 2003. Biofilms and the food industry. **Journal of Science and Technology**, 25: 807-815.
- Türetgen, İ. 2005. Su Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 79s, İstanbul.
- Urazel, B., Çelikel, A., Karbeyaz, K., Akkaya, H. 2014. Gıda zehirlenmesine bağlı rapor düzenlenen adli olguların değerlendirilmesi. **Dicle Tıp Dergisi**, 41: 113-117.

- Ülgen, H. 2019. Türkiye’de Yetiştirilen Ketencik Bitkisinin [*Camelina sativa (L.) crantz*] Antioksidan, Antimikrobiyal, Antifungal, Antibiyofilm Özelliklerinin ve Tohum Morfolojisinin Araştırılması. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 94s, Bartın.
- Verraes, C., Boxstael, S.V., Meervenue, E.V., Coillie, E.V., Butaye, P., Catry, B., Schaetzen, M.A., Huffel, X.V., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., Block, J.D., Dewulf, J., Herman, L.2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 10: 2643-2669.
- Watnick, P., Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**,182: 2675-9.
- Winkelströter, L., Teixeira, F., Silva, E., Alves, V., Martinis, E. 2014. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. **Microbial Ecology**, 68: 35–46.
- Yanık, E. 2020.Et Kaynaklı Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin ve Antibiyofilm Duyarlılıklarının Araştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 127s, Ankara.
- Yaralı, E. 2018. Gıda Zincirinde İzlenebilirlik. **Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**, 23: 108-119.
- Yedikardeş, B. 2016. Preparation and Characterization of Anti Bacterial, Anti Scratch and Easy to Clean Multifunctional Coatings by Sol Gel Method. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 95s, İstanbul.
- Yörük, N. 2012. ISO Gıda Güvenliği Sistemini Uygulayan Et Ürünleri İşletmelerinde Üretilen Sucuk, Salam, Sosis ve Hamburger Köftenin Gıda Patojenleri Yönünden Kontrolü. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi,125s, Konya.

Yüksel, A.2006. Yaygın nasal polipozis hastalarında biyofilm oluşumunun araştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., Zhong, N. 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **The Royal Society of Chemistry**, 7: 36670-36683.





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

AdıSoyadı : Mediha ONUR

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen  
Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### A) Bildiriler

-Çoban, EP., Onur M. “Isolation of Biofilm Forming Bacteria From Some Foods”.  
2nd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology  
(EurasianSciEnTech 2020), Turkey/Gaziantep, 07-09 October, 2020.

-Bıyık H.H., Onur M., Törün B., Çoban EP. “Biodiversity of Bacteria Isolated  
from Some Cosmetic Products”, The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity  
(SEAB-2018), Ukrania/Kyiev, 03-06 July, 2018.

-Çoban EP., Onur M., Törün B., Bıyık H.H. “Effects of the Stem and Leaf  
Extracts of *Urtica dioica* L. on Some Microorganisms”, The 4th Symposium on  
EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018), Ukrania/Kyiev, 03-06 July, 2018.

Tarih :././....