ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMOFİLİK BASİLLERİN BİYOFİLMLERİNDEKİ VEJETATİF HÜCRELERİN VE SPORLARIN ABİYOTİK ÇEŞİTLİ YÜZEYLERE ADEZYONLARI VE TUTUNAN BU HÜCRE- SPORLARIN YÜZEYLERDEN ELİMİNASYONU

Ayşe Büşra KARAKAYA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ayşe Büşra KARAKAYA tarafından hazırlanan "**Termofilik Basillerin Biyofilmlerindeki Vejetatif Hücrelerin ve Sporların Abiyotik Çeşitli Yüzeylere Adezyonları ve Tutunan Bu Hücre- Sporların Yüzeylerden Eliminasyonu**" adlı tez çalışması 11/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP
Gazi Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

11/01/2019



Ayşe Büşra KARAKAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TERMOFİLİK BASİLLERİN BİYOFİLMLERİNDEKİ VEJETATİF HÜCRELERİN VE SPORLARIN ABİYOTİK ÇEŞİTLİ YÜZEYLERE ADEZYONLARI VE TUTUNAN BU HÜCRE- SPORLARIN YÜZEYLERDEN ELİMİNASYONU

Ayşe Büşra KARAKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Tez kapsamında *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T, *Geobacillus thermoglucosidans* B84a, *Anoxybacillus kamchatkiensis* subp F81 ve *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T termofilik bakterilerin "yerinde temizlik" ajanları ile biyofilm giderimleri ve sporsidal ajanlar ile spor giderimleri çalışılmıştır. Süt endüstrisinde sıklıkla kullanılan altı farklı abiyotik yüzey üzerinde, bu termofilik bakterilere ait sporların tutunma desenleri epifloresan mikroskobisiyle incelenmiştir. DSM 465^T ve F81'in sporlarının çoğunlukla kauçuk, polikarbonat, PTFE (teflon) ve paslanmaz çelik yüzeylere tutunduğu belirlenmiştir. Termofilik basillerde test edilen sporsidal ajanlardan en etkili olanlarının sadece perasetik asit, setilpiridinyum klorür ve formaldehit olduğu bulunmuştur. Sporlar üzerinde yüksek etkinlik gösteren sporisidal ajanlar arasından, en kısa temas süresine, düşük toksisiteye ve maliyete sahip olmalarından dolayı perasetik asit ve nitrik asit seçilmiştir. Seçilen ajanların LD_{50} değerleri belirlenerek ikili kombinasyon etkileri test edilmiş ve açık bir şekilde aralarında sinerjism olduğu sonucuna varılmıştır. Son olarak, ideal koşullar altında örneklenen biyofilmlerin 15 sanitasyon ajanı ile giderimleri değerlendirilmiştir. DSM 465^T için tripsin, sodyum metaperiodat, subtilizin ve NaCl, B84a için tripsin ve TCA, F81 için nisin, DSM 2641^T için ise alkalin proteaz, sodyum metaperiodat, tripsin, TCA, SDS ve nisin en iyi sanitasyon ajanı olarak seçilmiştir. Biyofilm giderimleri, termofilik sporların tutunma desenleri ve sporisidal ajanlarla giderimleri ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır.

Ocak 2019, 141 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, biyofilm, termofilik basiller, sporulasyon, adezyon, biyofilm eradikasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

ADHESION OF VEGETATIVE CELLS AND SPORES OF THERMOPHILIC BACILLI BIOFILMS ON SOME ABIOTIC SURFACES AND ELIMINATION OF THESE CELLS/ SPORES FROM THE SURFACES

Ayşe Büşra KARAKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Deparment of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Within the scope of thesis, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T, *Geobacillus thermoglucosidans* B84a, *Anoxybacillus kamchatkiensis* subp F81 and *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T thermophilic members were studied for their biofilm eradication by "clean in place" agents and spore elimination by sporicidal agents. Thermophilic members were sporulated in order to investigate the spore adhesion patterns on different abiotic surfaces frequently used in dairy industry by epiflourescence microscopy. Thermophilic members such as DSM 465^T and F81 mostly preferred rubber and polycarbonate, PTFE and stainless steel surfaces respectively in terms of their spore adhesion. Only peracetic acid, cetylpridinium chloride and formaldehyde were found to be effective on all tested thermophilic bacilli. Peracetic acid and nitric acid, mostly effective sporicidal agents, were selected considering their short contact time, low cost and toxicity. Dual combinative effects of these agents were tested by determining their LC_{50} values and, it was clearly concluded that there was a synergism. Finally, biofilm eradication capabilities of 15 sanitation agents were evaluated for thermophilic biofilms sampled under ideal environmental conditions. Trypsine, sodium metaperiodate, subtilisin and NaCl for DSM 465^T, tyripsine and TCA for B84a, nisin for F81, alkaline protease, sodium metaperiodate, trypsine, TCA, SDS, and nisin for DSM 2641^T, respectively, were selected as the best sanitation agents. Eradication of biofilms and most importantly sporicidal efficacy of thermophilic spores and their adhesion patterns researched in details.

January 2019, 141 pages

Key Words *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, biofilm, thermophilic bacilli, sporulation, adhesion, biofilm eradication

TEŞEKKÜR

Tanıştığım andan itibaren ne kadar şanslı olduğumun her an farkında olduğum, kendisinin bana bir danışmandan daha çok anlam ifade eden varlığı ile, her türlü genel ve özel sorunumda bana sonuna kadar destek olan, yüksek lisans çalışmam boyunca deneyimlerini, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, üzerimdeki emeğinin hakkını ölene kadar ödeyemeyeceğim, saygıdeğer ve kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Kendisiyle lisans döneminde tanıştığım, bana karşı güleryüzlülüğünü, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarının kapısından ilk girdiğim günden itibaren yardımlarını esirgemeyen, aynı laboratuvarda çalışma şansı elde ettiğim, değerli hocam Dr. Başar KARACA'ya, bilgi ve birikimleriyle her daim bana kapısını açan Dr. Ergin ŞAHİN'e, güleryüzü ve yardımlarıyla her zaman danışabileceğimi bildiğim Ekin DEMİRAY'a,

Epifloresan çalışmalarım için bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Görevlisi Dr. Evren Doruk ENGİN'e,

Tez çalışmalarımda bana yardım ederek, benimle beraber saatlerini ve emeklerini harcayan çalışma arkadaşlarım olan, Seçil SARAN OKTAŞ, Gaye Ekin GÜRSOY ve Hikmet CAN'a,

Lisans üçüncü sınftan bu yana tanıdığım, beraber mezun olduğumuz, her sıkıntımda, her moral bozukluğumda yanımda olan ve her türlü desteğini benden esirgemeyen canım dostum, kardeşim, Duygu ÖZEL'e,

Çalışmalarımın geç saatlere sarkmasından dolayı beni okulun kapısında bekleyen, baş koyduğum bu yolun zorluklarını ilk günden itibaren anlayan, bu yaşıma kadar her türlü sıkıntıma göğüs germiş olan biricik babam ve anneme, kendilerine sahip olduğum için çok şanslı olduğum, her sıkıntımda yanıma koşan ve dünyaları verseler değişmeyeceğim abilerime,

Bu Yüksek lisans tezimi , 116Z422 kodlu "Süt Endüstirisinde, Termofilik Basillerin Biyofilm Oluşumlarının ve Biyofilm-Spor Giderimlerinin Mikrobiyolojik, Mikroskobik ve Moleküler Biyolojik Tekniklerle İncelenmesi" başlıklı 1001 projesi ile destekleyen, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK),

Saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Büşra KARAKAYA
Ankara, Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 *Bacillaceae* Ailesi Hakkında Genel Bilgiler **3**
2.1.1 *Bacillaceae* ailesi ve endospor üreten basillerin genel özellikleri 3
2.1.2 *Bacillaceae* ailesinde spor oluşumu 4
2.1.3 *Geobacillus* cinsi ile ilgili genel bilgiler 6
2.1.4 *Anoxybacillus* cinsi ile ilgili genel bilgiler 6
2.2 Biyofilmin Tanımı ve Yapısı Hakkında Genel Bilgiler **7**
2.3 Endospor Üreten Termofilik Basillerin Sporları ve Biyofilm Yapılarıyla Sebep Oldukları Sorunlar **9**
2.3.1 Süt ve süt ürünleri endüstrisindeki önemli termofilik basil kontaminantları 15
2.4 Sporisidal Ajanlar ile İlgili Genel Bilgiler **15**
2.4.1 Tez kapsamında kullanılan sporisidal özellikli kimyasal ajanlarla ilgili genel bilgiler 17
2.4.1.1 Formaldehit **19**
2.4.1.2 Gluteraldehit **20**
2.4.1.3 Fenol **22**
2.4.1.4 Nitrik asit **23**
2.4.1.5 Perasetik asit **23**
2.4.1.6 Hipoklorit **25**
2.4.1.7 Klorin dioksit **26**
2.4.1.8 Klorhekzidin diasetat **27**
2.4.1.9 Klorokrezol **27**
2.4.1.10 Krezol **28**
2.4.1.11 Setilpiridinyum klorit **28**
2.4.1.12 İyodin **29**
2.5 Yerinde Temizlik Elemanları (Cleaning- In- Place) İle İlgili Genel Bilgiler **29**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **34**

3.1 Materyal **34**
3.1.1 Tez kapsamında kullanılan bakteri kültürleri ve gelişme koşulları 34
3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler ve tampon içerikleri 34
3.2.1 Bakterilerin kültürlerinin hazırlanması 45
3.2.2 Bakterilerin azami seviyede spor ürettikleri besiyerlerinin belirlenmesi 46
3.2.3 Bakteri sporlarının saflaştırılması 47
3.2.4 Saflaştırılan sporların 6 farklı abiyotik yüzeyde adhezif özelliklerinin belirlenmesi 48
3.2.5 Sporisidal ajanların sporlar üzerindeki etkinliklerinin belirlenmesi 49
3.**2.5.1 Sporisidal ajanlar arasından en etkili olan ikisinin LD50 değerlerinin hesaplaması** **50**
3.2.5.2 Nitrik asit ve Perasetik asit için belirlenen LD50 değerlerine göre asitlerin ikili kombinasyonlarının etkinliklerinin belirlenmesi **51**
3.2.6 Biyofilm sistemlerindeki sporların ve planktonik fazdaki sporların ısıl inaktivasyon kinetiklerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması **52**
3.2.7 Statik koşullarda biyofilm örneklemesi ve örneklenen biyofilmlere giderim ajanlarının uygulanması **53**
3.2.8 İstatistik analizler 56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI **57**
4.1 En İdeal Mikrobiyal Gelişim ve Sporulasyon Gözlenen Besiyerinin Seçimi **57**
4.2 Saflaştırılan Sporların 6 Farklı Abiyotik Yüzeydeki Adezyon Özelliklerinin Etkilerinin Epifloresan Mikroskopu ile Belirlenmesi ve Karşılaştırılması **65**
4.3 Sporisidal Ajanların Termofilik Basillerin Sporları Üzerindeki Etkinliklerinin Belirlenmesi **73**
4.3.1 Yüksek etkinlik gösteren sporsidal ajanların LD_{50} değerlerinin belirlenmesi 95
4.3.2 LD_{50} değerleri belirlenen sporsidal ajanların kombine etkinliklerinin belirlenmesi 97
4.4 Biyofilm Sistemlerindeki Sporlar ile Vejetatif hücrelerin ve Planktonik Durumdaki Sporların Isıl İnaktivasyon Yanıtları **100**
4.5 Statik Koşullarla Biyofilm Örnekleri Üzerinde Seçilmiş Olan 15 adet Giderim Ajanının Eliminasyon Sonuçları **103**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **111**
KAYNAKLAR **123**
ÖZGEÇMİŞ **140**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Büyüktür
>	Küçüktür
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
ppm	part per million (milyonda bir birim)
Ca^{2+}	Kalsiyum katyonu
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
cm^2	Santimetre kare
$FeSO_4$	Demir sülfat
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HNO_3	Nitrik asit
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
log	Logaritma
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mililitre
M	Molar
N	Normalite
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ºC	Derece (Santigrat)
U	Ünite

v	Hacim
w	Ağırlık
α	Alfa

Kısaltmalar

A.	*Anoxybacillus*
B.	*Bacillus*
CIP	Yerinde temizlik
CRAs	Klorin salan ajanlar
DPA	Dipikolinik asit
DSM	Alman Kültür Kolleksiyonu
G.	*Geobacillus*
kob	Koloni oluşturan birim
MI	Medium I
OD	Optik dansite
P.	*Pseudomonas*
PP	Polipropilen
PTFE	Politetrafloroetilen
PVC	Polivinil klorür
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SF	Serum fizyolojik
sp.	species
subsp.	subspecies
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth
UHT	Yüksek Isıda Muamele
QACs	kuaterner amonyum bileşikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı sporulasyon besiyerlerindeki mikrobiyal gelişimi 24-48 saatlik 57
Şekil 4.2 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi 58
Şekil 4.3 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi 59
Şekil 4.4 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi 60
Şekil 4.5 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL)) 61
Şekil 4.6 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL)) 62
Şekil 4.7 *A. kamchatkensis* subsp. asaccharedens F81 izolatının farklı sporulasyonbesiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu sporulasyon miktarları (log(kob/mL)) 63
Şekil 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL)) 64
Şekil 4.9 Nitrik asit, perasetik asit ve nitrik asit-perasetik asit kombinasyonlarının doz yanıt eğrisi (*A. flavithermus* DSM 2641^T) NA; Nitrik Asit, PA; Perasetik Asit, NAPA; İkili Kombinasyon 98
Şekil 4.10 Nitrik asit- perasetik asit kombinasyonlarının isobologramı (*A. flavithermus* DSM 2641^T) 99
Şekil 4.11 Nitrik asit, perasetik asit ve nitrik asit-perasetik asit kombinasyonlarının doz yanıt eğrisi (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T) NA; Nitrik Asit, PA; Perasetik Asit, NAPA; İkili Kombinasyon 99
Şekil 4.12 Nitrik asit- perasetik asit kombinasyonlarının isobologramı (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T)..... 100
Şekil 4.13 Sıcaklık uygulamalarının *A. flavithermus* DSM 2641^T'in planktonik fazdaki sporlarının üzerindeki etkisi 101
Şekil 4.14 Sıcaklık uygulamalarının *A. flavithermus* DSM 2641^T'in biyofilm fazındaki sporlarının üzerindeki etkisi 101
Şekil 4.15 Sıcaklık uygulamalarının *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in planktonik fazdaki sporlarının üzerindeki etkisi 102
Şekil 4.16 Sıcaklık uygulamalarının *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in biyofilm fazındaki sporlarının üzerindeki etkisi 102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı termofilik basillerin sporlarının ısıl direnç profilleri (Burgess vd. 2010) 13
Çizelge 2.2 Sporsidal ajanların etki edebilecekleri spor kısımları (Russel 1990) 16
Çizelge 2.3 Biyosidal ajanların sınıflandırılması (Russell 1998) 17
Çizelge 2.4 Çalışma kapsamında kullanılan sporisidal ajanların açık formülleri ve toksisite dereceleri 18
Çizelge 2.5 Alkilleyici biyositlerin sporisidal aktiviteleri (Maillard 2011) 20
Çizelge 2.6 % 2'lik gluteraldehit çözeltisinin giderim etkisi (Boric 1968) 22
Çizelge 2.7 Perasetik asitin ve klorin dioksitin sporisidal aktiviteleri (Maillard 2011) 24
Çizelge 2.8 Sodyum hipokloridin sporisidal aktivitesi (Maillard 2011) 26
Çizelge 2.9 Bazı antibakteriyal ajanların sporisidal konsantrasyonları (Russell 1998) 29
Çizelge 2.10 Süt endüstrisindeki termofilik basillerin giderimi için kullanılan yaklaşımlar stratejiler (Gopal vd. 2015) 31
Çizelge 2.11 Tez kapsamında çalışılan kimyasal ve enzimatik ajanlar (Kılıç 2017) 33
Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan izolatlar ve referans suşlar 34
Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar Besiyeri içeriği 34
Çizelge 3.3 Standart Tam Yağlı Süt içeren besiyeri (%10'luk SKM- Skim Milk Medium) 35
Çizelge 3.4 Medium I Agar besiyeri içeriği (Suzuki vd. 1976 35
Çizelge 3.5 TBL besiyeri içeriği 35
Çizelge 3.6 TBL besiyeri içeriği için kullanılan tuz çözeltisi 36
Çizelge 3.7 TBL besiyeri içeriği için kullanılan Kalsiyum klorür çözeltisi 36
Çizelge 3.8 DSM 1X besiyeri içeriği 36
Çizelge 3.9 DSM 2X besiyeri içeriği 36
Çizelge 3.10 DSM 2X ve DSM 1X besiyerleri içeriği için kullanılan çözeltiler 37
Çizelge 3.11 1 M Ca(NO3)2 çözelti içeriği 37
Çizelge 3.12 0,1 M MnCl2.H2O çözelti içeriği 37
Çizelge 3.13 1 mM FeSO4 çözelti içeriği 37
Çizelge 3.14 % 50'lik glukoz çözeltisi içeriği 38
Çizelge 3.15 10 mM L-glutamik asit çözeltisi içeriği 38
Çizelge 3.16 % 8'lık Glutaraldehit çözelti içeriği 38
Çizelge 3.17 % 2,4'lük Formaldehit çözeltisi içeriği 38
Çizelge 3.18 % 12'lik Perasetik asit İçeriği 38
Çizelge 3.19 % 1'lik Setilpiridinyum klorür içeriği 39
Çizelge 3.20 % 2'lik Klorokrezol içeriği 39
Çizelge 3.21 % 2'lik Fenol içeriği 39
Çizelge 3.22 600 ppm'lik Klorin dioksit içeriği 39
Çizelge 3.23 % 1,5'luk m-kresol içeriği 39
Çizelge 3.24 1000 ppm'lik iyodin çözeltisi 39
Çizelge 3.25 % 0,5'lik Klorhekzidin diasetat çözeltisi 40
Çizelge 3.26 20 ppm'lik Sodyum hipoklorit çözeltisi 40
Çizelge 3.27 % 3'lük Nitrik asit içeriği 40

Çizelge 3.28 10 mM Tris-HCl Tamponu 40
Çizelge 3.29 50 mM Tris-HCl tamponu 40
Çizelge 3.30 0,02 N HCl içeriği 41
Çizelge 3.31 50 mM Sodyum Asetat tamponu 41
Çizelge 3.32 Sodyum Fosfat- NaCl tamponu 41
Çizelge 3.33 Borat- CaCl2 tamponu 41
Çizelge 3.34 50 mM Glisin- NaOH tamponu 42
Çizelge 3.35 Serum Fizyolojik 42
Çizelge 3.36 0,5 M NaCl çözeltisi 42
Çizelge 3.37 1 M NaCl çözeltisi 42
Çizelge 3.38 50 mM Sodyum metaperiodate çözeltisi 42
Çizelge 3.39 % 10'luk Trikloroasetik asit çözeltisi 43
Çizelge 3.40 % 3'lük Sodyum dodesil sülfat çözeltisi 43
Çizelge 3.41 2 mg/mL Potasyum monopersülfat çözeltisi 43
Çizelge 3.42 10 mg/mL Sodyum tiyosülfat çözeltisi 43
Çizelge 3.43 % 2'lik Lizozim çözeltisi 43
Çizelge 3.44 % 2'lik Tripsin çözeltisi 43
Çizelge 3.45 2 mg/mL'lik Nisin çözeltisi 44
Çizelge 3.46 % 1'lik Subtilizin çözeltisi 44
Çizelge 3.47 0,16 U/g Alkalen Proteaz çözeltisi 44
Çizelge 3.48 % 1'lik α- Amilaz çözeltisi 44
Çizelge 3.49 % 1,66'lık Selülaz çözeltisi 44
Çizelge 3.50 1 mg/mL Furanon çözeltisi 44
Çizelge 3.51 2 mg/mL Triklosan çözeltisi 45
Çizelge 3.52 % 0,001'lik Akridin oranj çözeltisi 45
Çizelge 4.1 Tez kapsamında çalışılan suşlar için belirlenen yüksek hacimdeki sporulasyon besiyerlerinden elde edilen spor stok konsantrasyonları 65
Çizelge 4.2 316 L tipi Paslanmaz çelik kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan Yeşil floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) 67
Çizelge 4.3 Polipropilen kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) 68
Çizelge 4.4 Polivinil klorür kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan Kırmızı floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈546 nm, Emission; ≈640 nm) 69
Çizelge 4.5 Polikarbonat kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) 70
Çizelge 4.6 Teflon kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) 71

Çizelge 4.7 Kauçuk kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) 72
Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^T için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları 75
Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları 80
Çizelge 4.10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorindioksitin ve fenolün spor eliminasyon sonuçları 85
Çizelge 4.11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları 90
Çizelge 4.12 *A. flavithermus* DSM 2641^T suşu üzerinde perasetik asit ve nitrik asitin farklı konsantrasyonlarının sporisidal etkinlikleri ve LD50 değerleri (Probit analizi) 95
Çizelge 4.13 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşu üzerinde perasetik asit ve nitrik asitin farklı konsantrasyonlarının sporisidal etkinlikleri ve LD50 değerleri (Probit analizi) 96
Çizelge 4.14 *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun sporları üzerinde LD50 dozlarına göre denenilen nitrik asit ve perasetik asit kombinasyonları ve yanıtları 97
Çizelge 4.15 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun sporları üzerinde LD50 dozlarına göre denenilen nitrik asit ve perasetik asit kombinasyonları ve yanıtları 97
Çizelge 4.16 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *A. flavithermus* DSM 2641^T'nin %10'luk SKM içerisinde, iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları 105
Çizelge 4.17 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *G. thermoglucosidans* B84a'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları 108

1. GİRİŞ

Endospor üreten termofilik basiller, içsel termostabilite göstermeleri ve sporlar üretebilmelerinin yanı sıra, biyofilm üretimleri ile de termostabilitelerine katkı sağlamaktadırlar. Bu basilleri bir arada yüzeye sabitleyen biyofilm matriksleri, hücrelerin doğrudan sıcak sıvı ile temasını engellemekte ve biyofilmin iç kısımlarındaki hücrelerin ısıl zarardan korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca, biyofilmin dışındaki hücreler ürettikleri matriks materyali ile içteki hücreler ve sporlar için bir siper oluşturarak, populasyonun canlı kalabilmesine imkân sağlamaktadırlar (Flint vd. 2001, Parkar vd. 2003).

Termofilik basiller, süt ve süt ürünlerinin, meyve sularının, glukoz şuruplarının yapımında kullanılan endüstriyel fermentörlerde ve ayrıca jeotermal termik santraller ve kömürle enerji üretilen santrallerde, sıcak su sondaj borularının iç yüzeylerinde, yüksek ısıya maruz kalmalarına rağmen ısıl adaptasyon yetenekleriyle kolaylıkla gelişebilmekte ve böylelikle hem fermentörlerin biyokorozyonuna hem de bu tür ortamlarda istenmeyen bir mikrobiyal yükün oluşmasına neden olmaktadırlar. Sonuçta, biyokorozyondan kaynaklı olarak gıda üretim çevrelerinde kullanılan alet, ekipman ve yüzey malzemelerinin kullanım sürelerinin azalmasından ötürü, ciddi düzeyde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Flint vd. 2001, Nazina vd. 2001, Vieille ve Zeikus 2001, Parkar vd. 2003).

Biyofilm üreticisi termofilik basiller, özellikle süt ve süt ürünlerinin işlendiği ortamlarda, sahip oldukları ekstrem sıcaklara dayanıklılık, endospor oluşturmaları ve ayrıca biyofilm üretebilme özelliklerinden dolayı, kullanılan tank ve aparatlarda sebep oldukları aşınmanın yanı sıra, üretilen süt ürünün kalitesini düşürdüklerinden, üretici için ciddi kayıplara sebep olmaktadırlar. Yapılan bu çalışmada, süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı makine ve teçhizat yüzeylerinde (316L tipi paslanmaz çelik, polivinil klorür, polipropilen, polikarbonat, kauçuk ve teflon) risk teşkil edebilecek 4 adet termofilik basilin (*Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^{T}, *Geobacillus thermoglucosidans* B84a, *Anoxybacillus kamchatkiensis* subp. *Asaccharedens* F81, *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^{T}) oluşturdukları spor yapılarının tutunma

karakteristikleri ile ekipmanların dezenfekte edilmesinde sıklıkla kullanılan kimyasal ajanların sporisidal etkileri değerlendirilmiştir.

Ayrıca, seçilen termofilik basillerin süt ve süt üretiminde kullanılan yüzey malzemelerinin üzerindeki biyofilm üretim karakteristikleri incelenmiş ve en ideal ikişer yüzey seçilerek, bu yüzeyler üzerinde gelişen biyofilm yapılarındaki hücre ve sporların eliminasyonunda kullanılabilecek kimyasal/enzimatik sanitasyon ajanlarının yerinde temizlik işlemleri (CIP) için uygulama potansiyelleri test edilmiştir.

Yapılmış olan bu tez çalışması, süt ve süt ürünlerinin işlendiği ortamlarda sıklıkla kullanılan makine ve teçhizatın yüzeyinde oluşan termofil biyofilmlerin ve biyofilm yapılarındaki sporların gideriminde, "yerinde temizlik çalışmaları" ve sporisidal ajan olarak tavsiye edilen kimyasalların en etkili olanlarının belirlenmesi sonucu; süt ve süt ürünleri üretiminde kullanılan aparatlarda oluşan zararlardan kaynaklı ekonomik kayıpların minimuma düşürülmesi ve son ürünlerin kalitesinin korunması açısından önem arz etmektedir. Ayrıca, tez ile mevcut sanitasyon stratejileri, yüksek biyofilm üreticisi termofilik basillerin oluşturduğu yoğun biyofilmler üzerinde süre, maliyet ve etkinlik kriterleri açısından yeniden değerlendirilmiş ve süt ve süt ürünleri endüstrisinde kullanılabilecek en etkin biyofilm/ spor giderim süreçleri belirlenmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular sonucunda, hem gıda endüstrisinde hem de süt ve süt ürünlerinin üretiminin ve işletiminin yapıldığı endüstride sıklıkla kullanılan 6 yüzeyin çalışılan 4 farklı termofilik basil sporları ile nasıl bir tutunma deseni oluşturduğuna, kullanılan sporisidal ajanlar ile termofilik basilin sporlarının elimine edilmesine, ısıl inaktivasyon denemeleri ile biyofilm sistemleri içerisindeki biyofilm hücrelerinin ve sporlarının direnç profillerine, yerinde temizlik elemanları ile biyofilm giderimine yeni bir bakış açısı getirilmiş olup, gelecekte süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işlendiği endüstrilerde çıkabilecek veya süregelen termofilik basil biyofilmlerin ile ilişkili sorunlara çözüm önerileri sunabilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Bacillaceae* Ailesi Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1 *Bacillaceae* ailesi ve endospor üreten basillerin genel özellikleri

Bacillaceae, endospor üreticisi, aerobik veya fakültatif anaerobik, basil (çubuk) şeklindeki bakterileri, fenotipik açıdan geniş bir çeşitlilikteki Gram pozitif veya Gram değişken (variable) cinsleri kapsamaktadır. *Bacillaceae* üyeleri, termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofil habitatlar da dahil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunan toprak kaynaklı mikroorganizmalardır (Coorevits vd. 2012, Logan ve De Vos 2015).

Bacillaceae üyeleri, özellikle zorlu endüstriyel işlemlerde yüksek pH ve sıcaklık değerlerine dayanıklı enzimleri nedeniyle pek çok fayda sağlamaktadır (Sharp vd. 1992). Yüksek talep arz eden ürünlerin birçoğu sporlu basillerin endüstriyel fermantasyon işlemler sonucunda düşük maliyetle kısa sürelerde üretilebilmektedir. Ayrıca, ilaç, farmakoloji, tarım, ambalajlama ve atık yönetiminde yararlı olabilecek, endüstriyel öneme sahip mikrobiyal hücre dışı maddeleri (EPS) barındırmaktadırlar (Vert vd. 2012). *Bacillaceae* üyelerinin termostabil enzimleri, endüstriyel olarak yüksek oranda talep gören hücresel ürünleri ve biyofilmlerde biyoteknolojik önem arz eden mikrobiyal hücre dışı maddeleri (Radchenkova vd. 2011) başta olmak üzere bu faydaları ile oldukça talep edilen bir mikrobiyal aile olarak bilinirler.

Bu ailenin üyeleri bazı avantajların yanı sıra bazı endüstriyel uygulamalarda ciddi sorunlara neden olabilirler. Spor oluşturma yeteneklerinden dolayı ve pH, tuzluluk ve sıcaklık gibi değişikliklere karşı direnç gösterebildiklerinden, birçok kimyasala karşı da direnç sergilemektedirler. Bu durum, vejetatif hücrelerinin yanı sıra biyofilm yapıları içerisinde bulunan sporların eliminasyonunu da oldukça zorlaştırmaktadır. Tüm bu belirtilen nedenlerle, içme suyu boru sistemleri, jeotermal enerji santralleri, sıcak su sondaj boruları ve hatlarının iç yüzeyleri, süt ve süt ürünleriyle temas eden yüzeyler,

meyve suları veya glikoz şuruplarının üretimde kullanılan paslanmaz çelik fermentör gibi çeşitli insan yapımı habitatların yaygın toprak kaynaklı kontaminatları oldukları için endüstriyel süreçler için riskler oluşturmaktadır (Etoa ve Michiels 1988, Flint vd. 2001a).

2.1.2 *Bacillaceae* ailesinde spor oluşumu

Birçok bakteri yaşamsal faaliyetlerini sürdüremeyeceği koşullar ile karşılaştığında kendini güvenceye almak amacıyla spor oluşturur. Bakteri, canlılığı için yeniden uygun koşullar oluşana kadar spor fazında dormant halde kalabilir. Sporlar ısıya çok dayanıklı olup, kuvvetli kimyasallar ve radyasyon muamelesi ile bile elimine edilmesi çok güç olan farklılaşmış yapılardır. Sporlar rüzgâr, su ya da hayvanların sindirim sistemi aracılığı ile kolaylıkla yeryüzünde yayılabilirler. Birçok türün endosporları 121 °C'de otoklavlandığında ölmekle birlikte, bazı dayanıklı bakteriyal sporlar 150 °C gibi yüksek sıcaklıklarda dahi hayatta kalabilir. Sporlar susuzluk, ultraviyole radyasyonu, kuvvetli asit bazlar ve kimyasal dezenfektanlar gibi diğer zararlı ajanlara karşı da dirençli olup, çok uzun süreler dormant halde kalabilirler (Madigan vd. 1997).

Spor, vejetatif hücrede bulunmayan pek çok tabaka içerir ve vejetatif hücreden daha kompleks bir yapıya sahiptir. En dıştaki tabaka ince kılıf şeklindeki proteinden oluşan ekzosporiyumdur. Bu yapının iç tarafında spora özgü protein tabakalarından oluşan spor kılıfı yer alır. Spor kılıfının altında korteks bulunur. Korteks gevşek çapraz bağlar içeren peptidoglikandan oluşur. Korteksin iç tarafında ise öz ya da spor protoplastı bulunur (Madigan vd. 1997).

Olgun sporun öz kısmı, kendini oluşturan vejetatif hücreden oldukça farklıdır. Özün su içeriğini azaltan yüksek miktardaki kalsiyum ve dipikolinik asitin yanı sıra, sporulasyon sırasında öz daha da susuz hale gelir. Düşük su içeriğine ek olarak öz içindeki pH, vejetatif hücre sitoplazmasının pH'ından daha düşüktür. Endospor oluşumu sırasında vejetatif hücre, ısıya dirençli ve üreme özelliği göstermeyen dormant bir yapıya dönüşür (Madigan vd. 1997).

Sporlar yüksek hücre yoğunluğuna veya beslenme stresine, özellikle karbon ve azot açlığına tepki olarak üretilirler (Schaeffer vd. 1965, LeDeaux ve Grossman 1995). Magnezyum, kalsiyum ve potasyum gibi minerallerin varlıkları olgun bir sporun gelişimi için önemlidir ve spor oluşum sürecine etkisi olduğu düşünülmektedir (Vinter 1969). Mineral tuzların, spor oluşumunun gerçekleştiği ortamlarda yaygın olarak bulunduğu yapılan araştırmalar ile görülmüştür (Cooney ve Frees 1976, Kaul ve Singh 1982, Warriner ve Waites 1999). Özellikle kalsiyumun, spor oluşum sürecinde yer alan genlerin ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (Oomes vd. 2009).

Bacillus türlerinin sporulasyonu (Setlow ve Johnson 2013), karbon ve/ veya azota karşı olan açlıkla başlar. Sporulasyon hem gen ekspresyonunun bir aktivatörü hem de bastırıcısı olan Spo0A proteininin fosforilasyonuyla başlatılır. Spo0A-fosfatın ana işlevi, RNA polimeraz ile ilişkili iki sigma (σ) faktörünü kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive etmek ve bu enzimin özgünlüğünü belirlemektir. Sporulasyon ilerledikçe, eşit olmayan bir hücre bölünmesi gerçekleşerek, ana hücre ve forespor denilen iki farklı yapı oluşur. Sigma faktörlerinin aktivasyonu veya ek olarak üretilmesi sonucunda, iki farklı bölüme yönelik farklı gen ekspresyonları oluşur. σ^F (sigma F) ve σ^G (sigma G) faktörleri foresporun gen ekspresyonunu yönlendirirken, σ^E (sigma E) ve σ^K (sigma K) faktörleri ana hücrenin gen ekspresyonunu yönlendirir. Sporulasyon sırasındaki hücrenin bu iki bölümleri arasında, gen ekspresyonlarının eş zamanlı yürütülmesi için eş zamanlı bir iletişim olur. Dış ve iç forespor membranları arasında kalın bir peptidoglikan korteks tabakası oluşur. Bu oluşum forespor protoplastındaki hacmin ve su içeriğinin büyük oranda azalmasıyla eş zamanlı meydana gelir. Aynı zamanda forespor pH'sinde düşüş olur. Forespor, ana hücre tarafından üretilmiş olan, çok miktarda piridin-2,6-dikarboksilik asiti (dipikolinik asit- DPA) alır, ki bu da foresporun su içeriğinin daha fazla düşmesine sebep olur. Sporulasyon, bitim aşamasına yaklaşırken, ana hücre kılıf proteinleri sentezleyerek sporun dış yüzeyini proteinli bir tabaka ile kaplanmasına sağlar. Bazı türlerde bu oluşuma, ekzosporiyum olarak adlandırılan büyük dışsal bir tabaka eklenir. Son olarak ana hücre lize olur ve spor çevreye salınır (Setlow 2007).

2.1.3 *Geobacillus* cinsi ile ilgili genel bilgiler

Cohn, ilk defa 1872'de *Bacillus* cinsini tanımladıktan sonra, bu takson yeniden ciddi düzenlenmelere maruz kalmış ve bu cinsle ilişkili birçok filogenetik grup yeni cinsler olarak tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır (Stackebrandt vd. 1987, Logan vd. 2009). *Bacillus* cinsinin, özellikle de termofilik üyelerinin, filogenetik ayrışması üzerine yapılan araştırmalar, bu basillerin bazılarının uygun taksonomik seviyelere yerleştirilmeleri için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir (Ash vd. 1991, Rainey vd. 1994, Nazina vd. 2001).

Özellikle doksanlı yıllarda yapılan çalışmalar, *Bacillus* cinsine ait türlerin yeniden sınıflandırılması ile sonuçlanmıştır (Wisotzkey vd. 1992, Shida vd., 1996, Heyndrickx vd. 1996, Heyndrickx vd. 1997, Heyndrickx vd. 1998, Waino vd. 1999, Heyrman vd., 2003, Goto vd. 2004, Yoon vd. 2004, Ren ve Zhou 2005). 2001 yılındaki taksonomik bir çalışma, *Bacillus stearothermophilus*'un yeni bir cins olarak *Geobacillus* adı altında yeniden sınıflandırılmasına yol açmıştır (Nazina vd. 2001).

Geobacillus cinsi, *Bacillus* cinsinin 5. Grup rRNA kladında sınıflandırılmış olan termofilik türleri içerir (Ash vd. 1991). Cins içindeki türler, % 96,5-99,5 oranında 16S rRNA dizi benzerliği göstermektedir (Nazina vd. 2001). G+C içerikleri % 45 ile % 69 arasında değişmekte ve cinsin üyeleri sub-terminal veya terminal endospor üretmektedir. Bu cinsin optimum gelişme sıcaklığı 50 °C'nin üzerindedir. *Geobacillus* üyeleri, sıcak su kaynakları, petrol alanları, derin deniz sedimentleri, şeker rafineleri, süt ve süt ürünlerinin üretildiği fabrikalar gibi sıcak ortamlardan izole edilebilmektedir (Zarilla ve Perry 1987, Nazina vd. 2001, Marchant vd. 2002, Ronimus vd. 2003, Tai vd. 2004, Takami vd. 2004, Scott vd. 2007).

2.1.4 *Anoxybacillus* cinsi ile ilgili genel bilgiler

Anoxybacillus cinsi ilk olarak Yeni Zelanda'daki sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (Heinen vd. 1982), o zamandan bu yana da ABD'deki Yellowstone Ulusal

Parkı' ndaki ve Türkiye'deki sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (Nold vd. 1996, Belduz vd. 2003). Bunun yanı sıra jelatin ekstrelerinden (De Clerck vd. 2004a, De Clerck vd. 2004b, De Clerck vd. 2004c) ve süt tozundan (Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scott vd. 2007) izole edilmiştir. *Anoxybacillus pushchinoensis*'in izolasyonu, *Bacillus flavothermus*'un *Anoxybacillus flavithermus* olarak yeniden sınıflandırılmasına neden olmuştur ve ilk olarak zorunlu anaerob basiller anlamına gelen *Anoxybacillus* cins ismi yeni bir cins altında tip suşu *Anoxybacillus pushchinoensis* ile beraber sınıflandırılmıştır (Pikuta vd. 2000). Ancak daha sonraları, bu cinsin üyelerinin aerotolerant veya fakültatif anaeroblar olduğu anlaşılmıştır (Pikuta vd. 2003).

Fakültatif anaerob olan *A. flavithermus* termofil olarak tanımlanır, hareketlidir ve terminal endosporlara sahiptir. Bu tür % 61'lik bir G+C içeriğine sahiptir ve 6,0–9,0 pH aralığında gelişir (Heinen vd. 1982). Yeni Zelanda'da bulunan bir kaplıcadan izole edilen türün geliştiği sıcaklık aralıklarının 30 °C ile 70 °C arasında olduğu ve optimum olarak 60 °C de geliştiği bilinmektedir. Bununla birlikte, süt tozundan elde edilen izolatlar, 50 ila 65 °C arasında değişen optimum bir gelişim sıcaklığına gereksinim duyabilmektedir (Cucksey 2002, Ronimus vd. 2003, Scott 2007).

2.2 Biyofilmin Tanımı ve Yapısı Hakkında Genel Bilgiler

Biyofilm, katı bir yüzeye tutunan ve çoğalan, mikrobiyal hücreler ile bu hücreleri çevreleyen hücre dışı polisakkaritler (EPS'ler), proteinler ve DNA içeren bir matriks yapısıyla karakterize edilen mikrobiyal bir topluluk olarak tanımlanır. Biyofilm üretimi, yüzeyde tutunan mikroorganizmaların gelişip çoğalmalarının bir sonucudur (Costerton vd. 1985).

Uygun koşullar altında biyofilm, başlangıçta organik maddenin bir metal yüzey üzerinde birikmesi ile gelişir, biriken organik madde daha sonra bakteriler tarafından kolonize edilir. Planktonik durumdan biyofilm durumuna geçiş, yeter sayı algılama (Quorum sensing), besin bulunabilirliği, stres gibi çeşitli çevresel ve fizyolojik tetikleyiciler tarafından düzenlenir. Biyofilm topluluğu, bir türü (monospecies) veya birden fazla sayıda türü (multispecies) içerebilir ve tek bir katmandan veya ağ benzeri 3

boyutlu yapılardan oluşabilir. Biyofilmler, besin, metabolit ve atık ürün değişimi için geçişler sağlayan su kanallarının dağıldığı geniş, karmaşık ve organize bakteriyal ekosistemlerdir (Sauer vd. 2007). Hatta biyofilm toplulukları, seçici baskı ile çoğalan popülasyonda zarar gören bireyleri ortadan kaldırabilecek özelliktedir (Bayles 2007). Biyofilm sistemlerinde rekabetin azalmasıyla ve ölü veya parçalanmış hücrelerden besinlerin salınması nedeniyle, sağlıklı bireyler için besinler daha kolay elde edilebilmektedir (Bayles 2007).

Mittelman'a (1998) göre, olgun bir biyofilmin oluşturulması, sisteme bağlı olarak birkaç saat ile birkaç hafta arasında sürebilir. Örneğin, tıbbi cihazlarda ürettiği biyofilm ile soruna sebep olan *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir deneyde, *P. aeruginosa*'nın 30 saniye içerisinde paslanmaz çeliğe tutunabildiği tespit edilmiştir. Endüstriyel bir su simülasyon deneyinde reaktör de geliştirilen biyofilm içindeki koloni oluşturma birimlerinin (kob), inkübasyon süresi 24 ila 96 saatlere uzatıldıkça, 420 ila 2123 kob/15 cm^2 olacak şekilde yaklaşık 5 kat arttığı gözlenmiştir (Florjanic ve Kristl 2011). Daha da önemlisi, süt ve süt ürünlerinin işlendiği ve üretiminin yapıldığı ekipmanlarda oluşan biyofilmlerin, gelişiminin çok daha hızlı olduğu bilinmektedir (8-12 saat), (Scott vd. 2007, Bremer vd. 2009). Pastörizatörün üretim bölümünde 12 saatlik süre sonunda cm^2 başına 106 bakteri düştüğü kaydedilmiştir (Bouman vd. 1982, Bremer vd. 2009).

Biyofilm, sıradan hücre bölünmesiyle kendi hızında yayılabilirken, aynı zamanda, boruların alt kısımlarını kolonize etmek için yapısında bulunan "öncü" hücreleri periyodik olarak serbest bırakmaktadır (Marchand vd. 2012). Biyofilmin dağılması genel olarak 3 sürece ayrılır: erozyon, aşınma ve parçalar halinde kopma (Garny vd. 2008). Erozyon (akışkan kesme kuvvetlerinin sonucu) ve aşınma (parçacıkların çarpışması) tek hücrelerin veya küçük hücre kümelerinin sürekli ayrılması olup, sadece biyofilmin yüzeyini etkiler. Dökülme de denilebilen biyofilmin büyük parçalar halinde kopması ise sadece biyofilm yüzeyini değil, tüm biyofilm yapısını etkiler (Morgenroth 2003). Biyofilmin gücüne bağlı olarak büyük parçalar halinde biyofilmin kopması, biyofilmin tamamen kaybına yol açabilir (Telgmann vd. 2004). Bununla birlikte orijinal

biyofilm yapısı, büyüklüğü ve ayrılma gücü, parçalanma sürecinin sıklığı ve kapsamı üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilir (Marchand vd. 2012).

Biyofilmler, çevresel koşullar ve kolonize olunan yüzeyler, biyofilmi ve biyofilmin devamlılığını sağlamak için gerekli olan bakteriyal genler ve matriksinde biriken hücre dışı ürünler ile karakterize edilir. Çok farklı biyofilm tipleri vardır ve bir bakteri türüne ait aynı suş farklı çevresel koşullar altında birkaç farklı biyofilm tipi oluşturabilmektedir (Marchand vd. 2012).

Biyofilm, % 10 oranında mikroorganizmalardan ve % 90 oranında organik- inorganik madde içeren matriksten oluşmaktadır. Biyofilm matriksinin temel bileşenleri: Su, polisakkarit, proteinler, lipidler ve hücre dışı DNA'dan (e-DNA) oluşmaktadır. Matriks, hücre dışı polimerik maddeler ile biyofilm tabakasındaki bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünülebilir (Zhang vd. 1999). Matriksin görevleri arasında: Dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma, biyofilm tabakasının bütünlüğünü ve birliğini sağlama, abiyotik veya biyotik yüzeylere tutunmada aracı olma, kimyasal ajanların difüzyonunu yavaşlatma ve hücreler arası bir iletişim ağı oluşturma bulunmaktadır. Matriksteki yoğun etkileşim, bakteriler arası genetik aktarım frekansını artırır ve hücre dışı enzimlerin birikmesiyle çok yönlü dışsal bir sindirim sistemi ortaya çıkar (Flemming ve Widenger 2010). Oluşan bu dışsal sindirim sistemi, dış ortama verdikleri enzimler sebebiyle, özellikle de süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde ürünün kalitesinin düşmesine sebep olur.

2.3 Endospor Üreten Termofilik Basillerin Sporları ve Biyofilm Yapılarıyla Sebep Oldukları Sorunlar

Gıda endüstrisinde biyofilmlerin ortaya çıkardığı başlığı sorunlar arasında: İşlem esnasında kullanılan tüplerin ve boruların tıkanması, buna mukabil içlerindeki sıvı akışının azalması sonucu üretim sürecinde ekipmanların çalışma sürelerinin azalması gelmektedir. Üretim sürecinde kullanılan ekipmanların yapısı özellikle paslanmaz çelik başta olmak üzere korozyona uğrar ve yüzey üzerinde biyofilm oluşması sebebiyle ısı transferinde azalmalar meydana gelir (Romney 1990, Zottola ve Sasahara 1994).

Biyofilm oluşumu ayrıca, üretim süreci içerisinde kullanılan algılayıcı saptayıcılarda ve detektörlerde korozyona ve bozulmaya sebep olarak büyük maddi kayıplara yol açarlar (Wirtanen vd. 1996).

Termofilik endospor üreticisi basillerin, sporları ve vejetatif hücreleri paslanmaz çelik üzerine tutunup olgun biyofilm oluşturduktan sonra; biyofilm içerisinde bulunan hücreler, sporlar veya biyofilmin bir parçası tutunduğu yerden ayrılarak ürün akışının sürekli kontaminasyonuna sebep olur (Flint vd. 1997).

Şimdiye kadar gıda endüstrisindeki termofilik endospor üreticisi basillerin üzerine yapılan araştırmaların çoğunluğunun süt endüstrisi odaklı olmasının başlıca sebebi: Süt ve süt ürünlerinin üretimi sırasında sıklıkla ısıyla pastörizasyon işlemlerinin kullanılmasıdır. Süt, ihtiva ettiği besinler ve mineraller açısından mikroorganizmaların gelişmesi için mükemmel bir ortam oluşturur ve sütün ısıyla muamele edilmesi sonucu zarar görmeyen termofilik endospor oluşturan basiller bu ortamda çok rahat gelişebilir. Ayrıca, ortamdaki besin eksikliğine bağlı olarak oluşan stresin biyofilm üretimine etkisi olduğu ve süt içerisindeki proteinin koagülasyonuna bağlı olarak ortamın düşen pH'sının da biyofilm tabakasının kalınlığına etki ederek, hücrelerde fizyolojik değişikliklere sebep olduğu da yapılan araştırmalar sonucu görülmüştür (Teh vd. 2014).

Spor oluşumunun süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işlendiği tesislerde nasıl gerçekleştiğini anlamak sporların kontrol edilebilmesin için elzemdir. Mezofillerdeki sporulasyon açlık, yüksek hücre yoğunluğu veya DNA hasarı ile tetiklenebilir (Cooney ve Freese 1976, Russell 1982). Genellikle, optimum sıcaklık ve pH gereksinimi spor oluşumu için vejetatif hücre büyümesi ile benzerdir, ancak her iki parametrenin aralığı daha dardır (Russell 1982) Süt ortamı içinde termofilik bakterilerde spor oluşumunu tetikleyen koşullar net olarak tanımlanmıştır. Magnezyum, kalsiyum ve potasyum gibi minerallerin varlığı sporulasyonda rol oymaktadır. Bu mineraller, spor oluşumu için önemli olduklarından, oluşum sürecinin aktivasyonu ile alakalı oldukları düşünülmüştür (Vinter 1969). Ayrıca, yapılan çalışmalarla kalsiyumun sporulasyon sürecinde yer alan genlerin ifadesini artırdığı saptanmıştır (Oomes vd. 2009). Divalent katyonlar formundaki mineraller, esas olarak dipikolinik asit (DPA) ile şelatlanarak spor

çekirdeğinde birikirler. DPA ile şelatlanmış baskın divalan katyon Ca^{2+} 'dur (Setlow 2006). DPA üretemeyen mutant sporların, kalsiyum biriktiremediği yapılan çalışmalar ile görülmüştür (Hintze ve Nicholson 2010). *Bacillus sporothermodurans* sporları üzerinde yapılan çalışmada, spor içerisindeki kalsiyum miktarının artan, ısı direnci ile ilişkili olduğu görülmüştür (Scheldeman vd. 2006). Ayrıca, spor çekirdeğinde bulunan iki değerlikli katyonun tipinin ısı direncini etkilediği de gösterilmiştir. Örneğin, kalsiyum ve magnezyum gibi çeşitli iyonları içeren besiyeri üzerinde üretilen *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus licheniformis* sporlarının, sadece magnezyum ile takviye edilmiş besiyerinde geliştirilenlere nazaran daha fazla dayanıklı oldukları bulunmuştur (Cazemier vd. 2001).

Sporun su aktivitesi de spor direncinde önemlidir. *B. sporothermodurans* sporlarının yapısının farklı ortamlardan izole edildiğinde değiştiği, yani UHT sütten izole edilen sporların çiğ sütlerden izole edilenlerden daha yoğun, daha küçük ve daha fazla ısıya dayanıklı olduğu saptanmıştır (Scheldeman vd. 2006). Yine bazı çalışmalarda belirli bir suşun optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda oluşturduğu sporların, ısıya daha dayanıklı olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Beaman ve Gerhardt 1986, Etoa ve Michiels 1988, Palop vd. 1999, Lee ve Sim 2006).

Mostert ve arkadaşları (1979), *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. pumilus*'un sporlarının 10 saniye boyunca 135°C'de yaşayabildiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, süt ürünlerinden elde edilen bazı *Bacillus* suşlarından (*B. licheniformis* dahil) sadece *B. sporothermodurans* 'ın 5 saniye boyunca >120 °C' lik yüksek ısıl işlemler sonrasında canlı kaldığı bulunmuştur (Scheldeman vd. 2006). Isıl direnç çalışmalarını laboratuvar denemeleriyle karşılaştırmak zordur. Çünkü sıcaklık, pH ve ortam bileşimi gibi sporulasyon koşulları spor direncine katkıda bulunabilir. Ek olarak, süspansiyon ortamı spor direncini etkileyebilir. Ancak, yapılan çalışmalar ile belirlendiği üzere, süt tozu fabrikasında termofilik basiller tarafından üretilen sporların, laboratuar ortamında üretilenlere göre ısıya daha dayanıklı oldukları bilinmektedir (Hill 2004).

Termofilik basillerin sporlarının rapor edilen ısıl direnç profilleri geniş ölçüde değişiklik göstermektedir (Çizelge 2.1). Schwarzenbach ve Hill'in (1999) yaptığı

çalışmalarda termofilik basillerden sadece *Geobacillus*'un sporlarının UHT uygulamalarından etkilenmeme eğiliminde olduğu görülmektedir (1–10 saniye boyunca 134-145°C), (Schwarzenbach ve Hill 1999). *Geobacillus* ve mezofilik *B. sporothermodurans* sporları, UHT uygulamasında (yaklaşık 3 saniye boyunca 140°C'de) hayatta kalma eğilimindedir ve (15-20 dakika boyunca 110-120 °C) tekrar gelişebilmektedirler (Hill 2004, Scheldeman vd. 2006).

Çizelge 2.1 Bazı termofilik basillerin sporlarının ısıl direnç profilleri (Burgess vd. 2010)

Türler	Suşların kökeni	Kesikli/Akış	Kullanılan Ekipman	İnokülasyon Çözeltisi	Sıcaklık	Canlı Kalma	Kaynaklar
G.stearothermophilus ATCC 7953	Kültür koleksiyonu	Kesikli	Paslanmaz çelik tüpler	Ringer solüsyonu içinde	121 °C	D-değeri* 42 s	Dogan vd. 2009
G.stearothermophilus ATCC 7953	Kültür koleksiyonu	Akış	Isı değiştirici	Ringer solüsyonu içinde	121 °C	D-değeri* 7,3 s	Dogan vd. 2009
Geobacillus spp.	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Doğal olarak kontamine edilmiş rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Evet, 6.4–7.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
Geobacillus sp.	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Hayır, yaklaşık olarak 9 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
A. flavithermus	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Doğal olarak kontamine edilmiş rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Hayır, 9.5–12 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
B. licheniformis NCTC 6346	Kültür koleksiyonu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	120 °C, 3 s	Hayır, 9 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
B. licheniformis	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	125 °C, 4 s	Hayır, 8.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
B. licheniformis	UHT puding	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri verilmemiş	Mostert vd. 1979
B. subtilis	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	120 °C, 4 s	Hayır, 7–10.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999
B. subtilis	UHT süt	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri verilmemiş	Mostert vd. 1979
B. pumilus	UHT süt	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri* verilmemiş	Mostert vd. 1979
B. sporothermodurans	UHT süt	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış, çiğ süt	125 °C, 5 s	Evet, D-değeri* 13 dk	Scheldeman vd. 2006
B. sporothermodurans	Çiğ süt	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış, çiğ süt	125 °C, 5 s	D-değeri* 2 dk	Scheldeman vd. 2006

D- değeri*, mikroorganizmaların belli bir süre içerisindeki ondalık inaktivasyon oranı.

Mikroorganizmaların yüzey özelliklerinin fiziko-kimyasal karakterizasyonu hakkında çeşitli çalışmalar vardır (Van der Mei vd. 1998). Fakat, sporların yüzey karakterizasyonu üzerine sadece birkaç çalışma yapılmış ve bunlar mezofilik türlerle sınırlı kalmıştır (Peng vd. 2001, Faille vd. 2002). Örneğin, bir *B. subtilis* sporunun dış tabakası, protein ve karbonhidratlardan oluşur (Waller vd. 2004). *B. cereus* ve *B. anthracis* gibi türlerin, sporlarında pili (Stalheim vd. 2001) proteinler, karbonhidratlar ile lipitler (Matz vd. 1970) içeren ve ekosporiyum olarak bilinen ek bir tabaka daha mevcuttur (Gerhardt vd. 1964).

Endüstriyel ortamlarda termofilik basillerin işleme ekipmanlarının yüzeylerinde oluşturdukları biyofilmler ile çoğaldıkları bilinmektedir. Üretim döngüleri çok uzun olduğunda, ekipmanlar üretim döngüsü arasında etkin bir şekilde temizlenmediğinde, geri beslemeli süreçler uygulandığında, termofillerle kontamine içerikler veya yan ürünler kullanıldığında termofilik basillerin popülasyonların çoğaldığı görülmüştür (Muir vd. 1986, Langeveld vd. 1990, Flint vd. 1997).

Sporlar yüzeylere vejetatif hücrelere nazaran genellikle daha yüksek bir afiniteyle yapışırlar, çünkü sporlar nispeten daha hidrofobik karakteristiğe sahiptir. Bir yüzeye yapışmayı müteakip, sporlar çimlenebilir, sonrasında ise vejetatif hücreler çoğalarak ve hücre dışı polisakkaritler üretebilir. Oluşan koloniler, tek bir hücrenin yapışmasından sonra bir biyofilm oluşana kadar, tüm yüzeyi kademeli olarak kaplayarak gelişmeye devam eder (Bower vd. 1996).

Her ne kadar süt ve süt ürünlerinin üretildiği birimlerde termofilik endospor üreten basiller ile ürünlerin kontaminasyonu, insan sağlığını ciddi anlamda tehdit etmese de termofilik basiller gelişimleri esnasında süt içeriğinin bozulmasına sebep olarak süt kalitesinin düşmesine, buna bağlı olarak sütün raf ömrünün kısalmasına ve üreticilerin maddi açıdan büyük çapta ekonomik kayıplara uğramasına sebep olur (Teh vd 2014).

2.3.1 Süt ve süt ürünleri endüstrisindeki önemli termofilik basil kontaminantları

Süt ve süt ürünleri endüstrisinde, termofilik basiller biyofilm üretme yeteneklerinden dolayı hijyen indikatörleri olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, termofiller, ürettikleri enzimler ve asidik ürünler ile ürün kalitesini bozmaktadır (Burgess 2010).

Süt tozu gibi son ürün olarak bilinen süt ürünlerinde çok sayıda (10^4 kob/g) termofilin tespit edilmesi, süt ürünlerinin işlendiği ortamların yetersiz hijyen koşullarına sahip olduğuna işaret etmektedir. İlk termofil bulaşısının, süt üretim işleminin yapıldığı yere, çiğ süt yoluyla ve spor biçiminde olduğu kabul edilmektedir. Fakat, çiğ sütün içerdiği termofilik bakteri sayısı, süt tozu üretiminde son üründe bulunan termofillerin sayısıyla ilişkili değildir (Muir vd. 1986). Aslında, çiğ süt içindeki termofillerin seviyeleri genellikle çok düşüktür (örneğin, <10 kob/ mL), (Hill ve Smythe 1994, McGuiggan vd. 2002). Daha yüksek seviyelerde hücrenin bulunduğu nadir durumlarda (örneğin >100 kob/ mL), bu çiğ süt içindeki baskın termofilik türler *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus coagulans* olma eğilimindedir. Bununla birlikte, bu kalitedeki çiğ süt işleme tabi tutulduktan sonra içerisindeki baskın termofillik türlerin *Anoxybacillus flavithermus* ve *Geobacillus spp.* olduğu görülmektedir (Burgess 2010).

A. flavithermus ve *Geobacillus* spp. dahil olmak üzere, zorunlu termofiller sadece 40-60 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişir (Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scott vd. 2007). *Bacillus* cinsine dahil fakültatif termofiller, bakterinin türüne bağlı olarak hem mezofilik hem de termofilik sıcaklıklarda gelişebilir. Süt ve süt ürünleri endüstrisinden izole edilmiş olan bazı termofilik örnekler şunlardır: *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* ve *B. subtilis* (Crielly vd. 1994, Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scheldeman vd. 2005).

2.4 Sporisidal Ajanlar ile İlgili Genel Bilgiler

Biyosit, geniş bir spektrumda mikroorganizmaları inaktive eden kimyasal ajanları tanımlayan genel bir terimdir. Biyositlerin antimikrobiyal aktivitesindeki etki

mekanizmaları dolayısıyla bu bağlamda kullanılan başka terimler de olabilir. Örneğin, bakteriyostatik, fungistatik, sporstatik gibi terimlerdeki "-statik" eki büyümeyi ve çoğalmayı engelleyici ajanları belirtirken, "-sidal" eki ise hedef organizmayı öldüren ajanları ifade eder (sporisidal, virüsidal ve bakterisidal gibi), (Russel 1990).

Sporisidal, sporstatikten farklı olarak, spor yapısının bütünlüğünü geri döndürülemez bir şekilde bozulmasına sebebiyet vererek sporların ölümüne neden olan kimyasal maddelere denir (Russel 1990). Sporstatikler ise sporların çimlenmesini engelleyen fakat tamamen öldürmeyen özellikteki kimyasallardır (Russel 1990). Çizelge 2.2'de kullanılabilecek sporisidal ajanların etki edebilecekleri spor kısımlarının içerikleri gösterilmiştir.

Antibakteriyal olarak da adlandırılan biyositlerin birçoğu sporisidal özellikte değildir (Russel 1990). Çok kuvvetli biyositler spor çimlenmesini, büyümesini veya her ikisini birden inhibe edebilir fakat; sporisidal özellikten daha çok sporstatik özellik gösterirler (Russel 1990).

Çizelge 2.2 Sporsidal ajanların etki edebilecekleri spor kısımları (Russel 1990)

Spor kısmı	**Spor İçeriği**	**Yorum**
Dış Spor Kılıfı	Genellikle protein	Alkali dirençli: disülfit bağlarını yıkan ajanlar ile giderilebilir.
İç spor kılıfı	Genellikle protein	Alkali ortamda çözülebilir.
Korteks	Genellikle peptidoglikan	Vejetatif hücreler duvarlarındaki peptidoglikandan farklıdır.
Kor	Protein, DNA, RNA, Dipikolinik asit (DPA), divalan katyonlar	DNA ile ilişkili özgün spor proteinleridir.

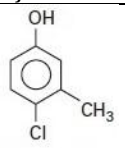
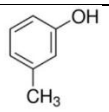
2.4.1 Tez kapsamında kullanılan sporisidal özellikli kimyasal ajanlarla ilgili genel bilgiler

Russell (1998) antibakteriyal içeriklerin Grup A ve B şeklinde iki ana grupta ayrılabileceğini ifade etmiştir. Grup A içerisinde bulunan fenoller, krezoller, parabenler, kuaterner amonyum yapıları (quaternary ammonium compounds-QACs), biguanitler bakterisidal (düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik) ve sporstatiktirler fakat; sporisidal değillerdir. Grup B içerisinde olanlar ise hem bakterisidal hem de sporisidaldırlar ancak; bu grup içerisindeki ajanların sporisidal etkilerini görmek için yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır (Russell 1998). Russel'ın (1998) yaptığı sınıflandırma çizelge 2.3'te görülmektedir. Ayrıca, tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan sporisidal ajanların, açık formülleri ve toksisite dereceleri çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 Biyosidal ajanların sınıflandırılması (Russell 1998)

Grup	Yorum
A- Bakterisidal, sporstatik fakat sporisidal değil. Fenolleri, organik asitleri ve esterleri, QAC'leri, biguanitleri, alkolleri ve organik cıva bileşiklerini içerir.	Yüksek konsantrasyonlarda ve sabit sıcaklıklarda uzun süreler boyunca muamele edilse dahi sporisidal değillerdir; fakat artan sıcaklıklarda sporisidal özellik gösterebilirler.
B- Bakterisidal, sporstatik, sporisidaldır. CRA'ları (Chlorine-Releasing Agents-Klorin Salan Ajanlar), etilen oksit, formaldehit, gluteraldehit, hidrojen peroksit, iyodin bileşikleri ve peroksi asitleri içerir.	Düşük konsantrasyonları sporisidaldır. Fakat konsantrasyonlarının arttırılması ve uygulama sürelerinin uzatılması gerekli olabilir.

Çizelge 2.4 Çalışma kapsamında kullanılan sporisidal ajanların açık formülleri ve toksisite dereceleri

Sporisidal Ajanlar	**Açık Formülleri**	**Toksisite Derecesi***
Klorokrezol (4-kloro-3-metilfenol)		Çevre için çok zararlı özelliktedir
Krezol (m-kresol)		Yutulduğunda ve deri ile temas ettiğinde toksik özellik göstermekte ve deri de yanıklara ve göz hasarına sebep olabilir
Fenol		Deride çeşitli yanıklara, göz ile temas ettiğinde görme kaybına ve genetik deformasyonlara sebep olduğu ve uzun süre maruz kalındığında ise iç organlara zarar verdiği bilinmektedir.
Hipoklorit	ClO^-	Paslanmaz çelik yüzeylerde, nötr veya alkali koşullar altında, düşük sıcaklıklarda güvenle kullanılırlar; ancak yüksek sıcaklıklarda ve asidik koşullarda oldukça aşındırıcı hale gelirler (Banner 1995).
Nitrik Asit	HNO_3	Yüksek derecede yanıcı özellik göstermekle beraber tahriş edici yapıda olduğu bilinmektedir.
İyodin	I_2	Deri ile temas ettiğinde cilde zarar verdiği ve solunduğunda solunum yollarında tahrişine sebep olduğu, deri yanmalarına ve göz tahrişine neden olduğu, uzun süre maruz kalındığında veya yutulduğunda iç organlara zarar verdiği, sucul hayat için toksik olduğu bilinmektedir.
Perasetik asit	CH_3COOH	Son ürünleri oksijen ve su olduğu için toksik etkisi yoktur (Fraise vd. 2008).
Klorin dioksit	ClO_2	Solunduğunda solunum yollarını ve deride tahriş edici etkiye sahiptir. Yüksek konsantrasyonda uzun süre solunduğunda ise solunum yollarında birikmeye ve su toplanmasına sebep olur. Yüksek derecede yanıcı özellik ve aktivite göstermektedir.
Klorhekzidin diasetat	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.C_2H_4O_2$	Uzun süren toksik etkisi vardır. Yutulduğunda zehirleyicidir. Sucul hayata karşı çok zehirli etkisi vardır.
Setilpridinyum klorit	$C_{21}H_{38}ClN.H_2O$	Tahriş edici özellikte ve yüksek derecede zehir etkisi ihtiva etmektedir. Çevre için çok zararlıdır.
Gluteraldehit	$OHC(CH_2)_3CHO$	Solunduğunda veya cilt ile temasında tahrişe sebep olabilir.
Formaldehit	CH_2O	Yüksek derecede toksik etkiye sahip olmasının yanı sıra aynı zamanda kansorejendir.

2.4.1.1 Formaldehit

Aldehitler, sporların çimlenmesine sebep olan bazı proteinler ve nükleik asitler ile bağlantılı çeşitli kimyasal grupları alkillemek suretiyle makromoleküllerin çapraz bağlanmasına neden olarak (Al-Adham vd 2012), makromolekülleri etkisiz hale getirirler ve böylelikle sporları öldürürler (Williams ve Russel 1993).

Bir aldehit olan formaldehit, CH_2O formülüne sahip organik bir bileşiktir. Karbonil grubunun boş olan iki bağına birer hidrojen bağlanmıştır. Bakterilere, bakteri sporlarına, mantarlara ve birçok virüse karşı sidal aktivitesi olan bir mikrobisidal ajandır. Dezenfektan olarak ilk defa 1892 yılında kullanılmıştır. Sporisidal etkisi glutaraldehit ile kıyaslandığında daha uzun sürede gerçekleşir (Rubbo vd 1967).

Formaldehit, proteinler ile kolayca reaksiyona girer ve yüksek protein içeriğinde etkinliği daha azdır (Heinzel 1988). Birincil amid ve amino gruplarına bağlanarak protein molekülleri ile etkileşime girer. Buna karşın fenolik kısımlar aldehite daha az bağlanır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda formaldehitin fenolik veya indol kalıntıları ile moleküllerdeki protein veya amino gruplarıyla çapraz bağlantı kurduğu anlaşılmıştır (Al-Adham vd. 2012). Formaldehit ile öldürülen sporların DNA hasarı sonucu öldüğü bilinmekle beraber DNA hasarının boyutu saptanamamıştır. Ayrıca, spor kılıfının sporun formaldehit direncinde önemli bir rol oynamadığı da bilinmektedir (Loshon vd. 1999).

Diğer biyositler, aldehitler de dahil olmak üzere hücre duvarındaki peptidoglikan bileşenlerine kovalent olarak bağlanırlar (Maillard 2002). Alkilleyici biyositlerin çeşitli sporlu basiller üzerindeki sporisidal aktivite çalışmaları çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5 Alkilleyici biyositlerin sporisidal aktiviteleri (Maillard 2011)

Spor	Konsantrasyon	Log_{10} Azalma Oranı	Zaman (h)	Referans
Formaldehit				
B. subtilis globigii	100 000 ppm	6	1	(Jones vd. 1996)
B. subtilis globigii (2-7x 10^6)	80 000 ppm	0,8	0,5	(Sagripanti vd. 1996a)
B. anthracis	20 000 ppm	5	1	(Vidal vd. 1996)
B. cereus	20 000 ppm	5	4	(Rogers vd. 2007)
G. stearothermophilus	20 000 ppm	5	24	(Rogers vd. 2007)
B. subtilis	1100 ppm	5	10	(Rogers vd. 2007)
B. anthracis	1100 ppm	5	10	(Rogers vd. 2007)
G. stearothermophilus	1100 ppm	5	10	(Rogers vd. 2007)
Glutaraldehit				
B. anthracis (10^8)	20 000 ppm	4	0,4	(Rubbo vd. 1967)
B. subtilis globigii (2-7x 10^6)	20 000 ppm	2,5	0,5	(Sagripanti vd. 1996a)
B. subtilis (10^9)	20 000 ppm	>5	1	(Coates 1996)
[Sporisidin +%7,05 fenol + %1.2 sodyum fenat]	20 000 ppm (1/8)	>6	8	(Coates 1996)
Clostridium difficile (≈10^5)	20 000 ppm	>4.1	0,5	(Wullt vd. 2003)

2.4.1.2 Gluteraldehit

Ticari ismiyle glutaral olarak bilinen gluteraldehit, eczacılık, denizcilikte ve ameliyathanelerde dezenfektan olarak, ilaç endüstrisinde ise siğil tedavisinde ilaç olarak kullanılır. Gluteraldehit antikorozif olup, sporlar da dahil olmak üzere antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış bir kimyasaldır. Sıvı gluteraldehitin kimyasal formülü $OHC(CH_3)CHO$ olarak bilinir.

Aldehit grubuna dahil olan glutaraldehit, önemli bir antimikrobiyal ajandır. Alkali pH'da etkisinin artarak hücre yüzeyinde değişikliklere sebep olduğu kabul edilmektedir (Russell ve Hopwood 1976, Gorman vd. 1980, Russell 1982)

Glutaraldehit, amino asitlerin alfa amino grupları ile etkileşime girer. Gluteraldehitin reaksiyon hızı pH'a bağlıdır ve pH 4,0 ila 9,0 aralığında etkinliği önemli ölçüde artar. Glutaraldehitin düşük konsantrasyonları spor germinasyonunu inhibe eder ve daha yüksek aldehit konsantrasyonunda ise sporların ölümüne sebep olur (Thomas ve Russel 1974, Thomas ve Russell 1975). Glutaraldehit aktivitesi, çözeltinin pH' ından çok etkilenir. Aktivite pH 8,0' de en yüksektir; fakat polimerizasyondan dolayı stabilitesi azalır. Buna karşın, asidik çözeltileri daha stabildir ancak mikrobisidal olarak daha az etkili olurlar ve bu da esas olarak polimerizasyonlarından kaynaklanmaktadır (Al-Adham vd 2012). Ayrıca, sıcaklık arttığında, asidik çözelti içinde bulunan polimerik formda bir bozulmaya ve serbest halde bulunan aktif monomerik dialdehitin artmasına bağlı olarak daha etkili bir mikrobisidal aktivite oluştururlar (Al-Adham vd 2012).

Glutaraldehitin etki mekanizması, RNA, DNA ve protein sentezini etkileyen hidroksil, amino, karboksil ve sülfhidril gruplarının alkilasyonunu içerir. Ayrıca, glutaraldehit, hücre zarında proteinlerin ve makromoleküllerin çapraz bağlanmasına neden olur. (McDonnell ve Russell 1999). Munton ve Russell (1970) yaptıkları elektroforetik mobilite ölçümlerine göre, asit glutaraldehitin spor kılıfıyla etkileşime girdiğini ve spor kılıfında kaldığını, alkali glutaraldehitinin sporun iç kısmına nüfuz ettiğini bulmuşlardır. Glutaraldehit aynı zamanda daha az toksik özelliğe ve daha az tahriş edici özelliğe sahiptir ve formaldehite kıyasla kokusu daha az rahatsız edicidir (Banner 1995). Boric'in 1968' te gluteraldehitin patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkisini belirlediği çalışma ile ilgili veriler Çizelge 2.6'da sunulmuştur.

Çizelge 2.6 % 2'lik gluteraldehit çözeltisinin giderim etkisi (Boric 1968)

Mikroorganizma	Çalışılan Mikroorganizma Türü	Giderim Süresi
Bakteriler	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes,* *Streptococcus pneumoniae,* *Escheriehia coli,* *Pseudomonas aeruginosa,* *Serratia marcescens,* *Proteus vulgaris,* *Klebsiella pneumoniae,* *Micrococcus lysodeikticus.*	<1 dakika
Tüberküloz basilli	*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv	<10 dakika
Bakteriyal sporlar	*Bacillus subtilis,* *Bacillus megateriuni,* *Bacillus globigii,* *Clostridium tetani,* *CIostridium perfringens.*	<3 saat
Virüsler	Polio types I and 11, Echo type 6, Coxsackie B-I, Herpes simplex, Vaccinia, Influenza A-2 (Asian), Adeno type 2, Mouse hepatitis (MHV3).	<10 dakika

2.4.1.3 Fenol

Fenol boyacılıkta, bazı plastik maddelerin ve ilaçların yapımında kullanılan, çoğunlukla maden kömürü katranından elde edilen benzenin oksijenli bir türevidir. Kimyasal formülü $C_6H_6O_6H$ olan bu organik bileşik beyaz kristal yapıda bir katı olup kendine has bir kokusu vardır. Fenol sıcaklığa dayanıklı ve zehirlidir.

Fenoller ve alkoller, amino asit kalıntılarına bağlanarak ve mevcut su moleküllerinin yerini değiştirerek protein yapısını bozarlar (Ingram vd. 1984). Protein yapısında meydana gelen bu değişiklikler, kullanılan fenol ve alkolün konsantrasyonuna bağlıdır. Protein yapısındaki değişimler enzim inhibisyonu ile sonuçlanır. Membran proteinlerinde daha belirgin olan konformasyonel değişiklikler, membran hasarına ve

bundan dolayı hücre bileşenlerinin dışarı sızmasına neden olurken meydana gelen bu denatürasyon sonucu sitoplazmadaki proteinler koagüle olur (Lucchini 1990).

Fenol, spor üreticisi bakterilerin vejetatif formlarına karşı etkili olmakla beraber, sporlara karşı etkisiz olabilmektedir (McDonnell ve Russell 1999). Bakteriyel sporlar, yüksek konsantrasyonlardaki fenole direnç gösterir. Fakat düşük konsantrasyonlardaki fenol sporların çimlenmesini inhibe edebilmektedir (Russell 2003). Fenol, antibakteriyal ajan olarak artık önemli bir yere sahip olmamasına rağmen bu ajan AOAC Uluslararası fenol katsayısı yöntemlerinin kullanıldığı standart konsantrasyonlarda (Beloian 1990) mikrobiyal aktivite göstermektedir. Sagripanti ve Bonifacino'nun (1996b) yürüttükleri bir çalışmada fenolün, çalışılan üç farklı sıcaklıkta da bakteri sporlarını inaktive etmediği ve sporisidal aktivitenin değerlendirilmesi için fenol katsayısı yöntemlerinin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

2.4.1.4 Nitrik asit

Kimyasal formülü HNO_3 olan nitrik asit, organik maddeler üzerinde yakıcı ve sarartıcı bir etki gösteren ve kezzap olarak da bilinen sanayide kullanım potansiyeline sahip bir asit türevidir. Szabo vd. (2014) yaptığı çalışmalara göre, *Bacillus* sp. sporları kademeli olarak artan konsantrasyonlarda nitrik asit ile muamele edilmiş ve *Bacillus* sp. sporlarında azalma gözlenmiştir.

2.4.1.5 Perasetik asit

Peroksi asetik asit olarak da bilinen perasetik asit (kimyasal formülü CH_3CO_3H) son derece korozif olup, renksiz sıvısı çok keskin bir kokuya sahiptir.

Perasetik asitin, proteinleri denatüre ettiği, hücre duvarı geçirgenliğini bozduğu, proteinler, enzimler ve diğer metabolitlerde sülfhidril ve sülfür bağlarını oksitlediği düşünülmektedir (Baldry 1983). Hidrojen peroksit, hipoklorit, perasetik asit ve izotiazolonların hepsi oksitleyici maddelerdir. Mikrobisidal aktiviteleri, proteinler

üzerinde, özellikle sistein kalıntılarının tiyol gruplarında oksitleyici etkilerinden kaynaklanır. Sistein kalıntılarındaki tiyol grupları, protein yapısının ve fonksiyonunun önemli belirleyicileridir (Thurman ve Gerba 1988, Collier vd. 1990). Dehidrojenazlar da dahil olmak üzere birçok yaşamsal mikrobiyal enzim, aktif bölgelerinde sistein kalıntıları içerir. Bu enzimlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonu, hücrenin metabolik inhibisyonuna sebep olur (Thurman ve Gerba 1988, Collier vd. 1990). Ayrıca, hücre duvarındaki, membran ve ribozomlarda bulunan yapısal proteinler, sistein kalıntıları arasındaki stabilize edici disülfür çapraz bağlarının bozulmasından da etkilenebilirler (Narayan vd. 2000).

Perasetik asit, hidrojen peroksitten daha kuvvetli bir mikrobisidal ajandır ve aktivite aralığı daha geniştir. *Mycobacterium*'lara, sporlara, küflere, mayalara, alglere ve virüslere karşı etkilidir. Endoskop borusu gibi tekrar kullanılabilen medikal malzemeler için kemo-sterilizan olarak kullanılmaktadır (Fraise vd. 2008). Maillard'ın (2011) gösterdiği perasetik asit ve *Bacillus* sporları ile yapılan çalışmalarla ilgili veriler çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7 Perasetik asitin ve klorin dioksitin sporisidal aktiviteleri (Maillard 2011)

Spor Konsantrasyonu	**Konsantrasyon (pH, Sıcaklık)**	**Log_{10} Azalma Oranı**	**Zaman (dk)**	**Kaynak**
Perasetik Asit: Yüzey Testi				
B. subtilis globigii sporları ($2\text{-}7x\ 10^6$)	300 ppm (pH 2.6)	2.2	30	(Sagripanti vd. 1996)
B. subtilis anthracis, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* (10^6)	3000 ppm	≥6	10	(Majcher vd. 2008)
B. atrophaeus (10^6)	2600 ppm	<3	10	(Block 2004)
B. subtilis (10^9)	3500 ppm	>5	2	(Coates 1996)
C. difficile ($\approx 10^5$)	3500 ppm	>4	5	(Block 2004)
C. difficile ($\approx 10^5$)	2600 ppm	6	10	(Block 2004)

Çizelge 2.7 Perasetik asitin ve klorin dioksitin sporisidal aktiviteleri (Maillard 2011) (devam)

C. difficile (>10^4)	2600 ppm	>4	5	(Block 2004)
Sıvı Klorin Dioksit: Yüzey Testi				
B. subtilis (2.5 x10^6)	≈630 ppm	≥6	≈5	(Perez vd. 2005)
B. subtilis (10^6)	600 ppm	≥6	15	(Perez vd. 2005)
B. anthracis, *B. subtilis*, *B. atrophaeus* (10^6)	1000 ppm	5	20	(Majcher vd. 2008)
B. licheniformis (10^6)	1000 ppm	4	20	(Majcher vd. 2008)
Clostridium sporogenes (9x10^6)	600 ppm	≥6	10	(Perez vd. 2005)
C. difficile (2.7x10^7)	600 ppm	≥6	10	(Perez vd. 2005)
Sıvı Klorin Dioksit: Karışım Testi				
B. subtilis	97 ppm	>5	2,5	(Coates 2001)
B. cereus	200 ppm (≈pH 11)	5,4	5	(Beuchat vd. 2004)

2.4.1.6 Hipoklorit

Hipoklorit ClO^- formülüyle gösterilen bir iyon kökü olup, bu kök bileşiklerden elektron koparır. Deodorant, dezenfektan ve beyazlatıcı formüllerinde bu moleküle rastlanır. Klorun mikrobiyal hücreleri hangi mekanizmalarla yok ettiği hala bilinmemektedir. Fakat, mikroorganizmalara karşı klor aktivitesinin; sülfhidril enzimlerinin ve amino asitlerin oksitlenmesi, amino asitlerin halka klorlanması, yapısal proteinlere, karbohidratlara ve lipitlere saldırarak hücre duvarı ve zarın bozulması, sitoplazma içeriğinin kaybı, besin alımının azalması, protein sentezinin inhibisyonu, azalmış oksijen alımı, oksidatif fosforilasyon ve diğer membrana bağlı enzim aktivitelerinin bozulması, doğrudan protein yıkımı, azalmış adenosin trifosfat üretimi, DNA ve sentezi esnasında kırılmalar gibi çeşitli hedeflere yönelik olduğu düşünülmektedir (McDonnell 2007). Hipoklorit uygulanması sonrasında spor aktivitesini yitirir ve kararır, korteksten spor kılıfı belirgin bir şekilde ayrılır ve sonunda liziz oluşur (Kulikovsky vd. 1975). Hipokloritler, paslanmaz çelik yüzeylerde, nötr veya alkali koşullar altında ortam ve

düşük sıcaklıklarda güvenle kullanılırlar, ancak yüksek sıcaklıklarda ve/veya asitdik koşulları altında oldukça aşındırıcı hale gelirler (Banner 1995). Maillard'ın 2011 yılında sodyum hipokloritin spor üzerindeki etkileri çizelge 2.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.8 Sodyum hipokloridin sporisidal aktivitesi (Maillard 2011)

Spor	Çözeltinin Konsantrasyonu	Log_{10} Azalma Oranı	Zaman (dk)	Kaynak
Sodyum hipoklorit: Yüzey Testi				
B. subtilis globigii (2-7x 10^6)	500 ppm	2.2	30	(Sagripanti vd. 1996)
B. anthracis, B. subtilis, B. atrophaeus, B. licheniformis (10^6)	5000 ppm	≥6	10	(Majcher vd. 2008)
Sodyum hipoklorit: Çözelti Testi				
B. subtilis	100 ppm	4	5	(Sykes 1990)
B. subtilis	1000 ppm	5	0,5	(Sykes 1990)

2.4.1.7 Klorin dioksit

Klorin dioksit oda ısında sarımsı- yeşilden kırmızıya kadar farklı renk skalalarında bulunan bir gaz olup suda çözünür. Ağız gargaralarının yapımında, içme suyunun dezenfeksiyonunda kullanılır. Kimyasal formülü ClO_2'dir. Klorin dioksit, klor gibi, bir dezenfektan olarak da kullanılabilen güçlü bir oksitleyici maddedir. Bakteri sporlarına karşı klordan daha etkilidir. Klorin dioksitin klora göre başlıca avantajlarından birisi dezenfektanlar gibi klorlama maddesi olmadığından, amonyak veya organik maddelerle, kloraminler veya trihalometanlar gibi toksik maddeler oluşturmak üzere reaksiyona girmemesidir. Ayrıca, klorin dioksit çözeltisinde açığa çıkmamış klorinin, daha az korozyona sebep olduğu iddia edilmektedir. Klorin dioksit ürünlerinin toksisitesi ve sebep olduğu tahriş, klorine nispeten daha yüksektir ve düşük maliyetle üretiminden dolayı gıda hijyeninde kullanım potansiyeli vardır (Banner 1995).

Çizelge 2.7'de görüldüğü üzere klorin dioksitin uygulama süreleri, uygulanan kimyasalın sıvı çözeltisinin konsantrasyonları ve sporlar üzerindeki etkileri verilmiştir.

Yüksek konsantrasyonlardaki klorin salan ajanlar (CRAs) sporisidaldır (Bloomfield ve Arthur 1992, Russell 1994, Russell ve Day 1996). Bu salınım da mevcut klorun pH değerine ve konsantrasyonuna bağlıdır (Rudolf ve Levine 1941, Russel 1982). Uygulama sırasında sporlar bütünlüğünü kaybeder yani spor kılıfı korteksten ayrılırak lize olur (Kulikovsky 1975). Ayrıca, yapılan çalışmalarda klorin salan ajanlar ile muamele edilmiş sporların spor kılıflarının geçirgenliğinin arttığı sonucuna da varılmıştır (Dye ve Mead 1972, Kulikovsky 1975, Russell 1982).

2.4.1.8 Klorhekzidin diasetat

Klorhekzidin diasetatın kimyasal formülü $C_{26}H_{38}Cl_2$'dir. Bir dezenfektan ve antiseptik olarak bilinen bu kimyasal temel olarak tuz formlarıyla kullanılır. Klorhekzidin sporisidal bir ajan olarak kabul edilmez (Fraise vd. 2008). Fakat klorheksidin diasetat, spor üreticisi olmayan bakterilere karşı düşük konsantrasyonlarda aktivite gösteren güçlü bir antimikrobiyal kimyasaldır (Fraise vd. 2008). Klorhekzidin diasetat sporun hidrofobisitesini yükseltir; fakat yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek sıcaklıklarda kullanılmadığı sürece sporisidal değildir (Shaker vd. 1986, Gorman vd. 1987, Shaker vd. 1988a, Shaker vd. 1988b).

2.4.1.9 Klorokrezol

Pembemsi kristal bir toz olan klorokrezolün kimyasal formülü C_7H_7ClO'dur. Krem formülasyonlu ilaçlarda ve dezenfeksiyonda kullanılır. Diğer bir adı 4-kloro-3-metilfenol olan klorokrezol, 65 °C'de eriyen bir bileşiktir. Başta suda (3,8 g /L) olmak üzere etanol, eter ve terpenler içerisinde kolayca çözünür. Ayrıca, alkali çözeltilerde de çözünür. Tutkallar, boyalar, yağlar ve sondaj çamurları gibi endüstriyel ürünler için ve topikal preparatlar, enjeksiyonlar ve kozmetikler gibi farmasötik ürünler için bir koruyucu olarak kullanılmıştır (Fraise vd. 2008). Çizelge 2.9'da sporisidal ajan olarak kullanılması için tavsiye edilen konsantrasyonlar verilmiştir.

2.4.1.10 Krezol

Krezol, metilfenol sınıfından organik bir bileşik olup C_7H_8O kimyasal formülasyonundadır. Çoğunlukla, doğal halde veya aromatik bileşiklerden elde edilir. Ortam ısısına bağlı olarak katı veya sıvı halde bulunur. % 0,08' lik krezol ve % 0,02' lik klorokrezol (w/v) çözeltileri sporların çimlenmesini önleyici mahiyettedir (Russell 1982). Literatürde krezolün sporisidal özelliklerine ve etki mekanizmalarına yönelik tatmin edici veriler bulunmamakla beraber, Russell'ın (1982) yaptığı çalışmalardan, uzun zamandır dezenfektan ajan olarak kullanıldığı anlaşılmaktadır. Çizelge 2.9'da sporisidal ajan olarak kullanılması tavsiye edilen konsantrasyon değerleri verilmiştir.

2.4.1.11 Setilpiridinyum klorit

Setilpiridinyum klorür olarak da bilinen setilpiridinyum klorit, kuaterner bir amonyum bileşiğidir. Katyon olarak N-hekzadesil piridinyum ve anyon olarak da klor içeren bir pirinyum tuzudur. $C_{21}H_{33}ClN$ kimyasal formülasyonuna sahiptir. Farmasötik olarak, küçük yaraların yüzeylerinin (çözelti içerisinde % 0,1-0,5 olmak üzere) antiseptik tedavisi için, ağız ve boğaz için antiseptik olarak (örneğin 1–2 mg QAC içeren pastiller) ve emülsiyonlarda koruyucu olarak kullanılır (Fraise vd. 2008). Krezol gibi setilpiridinyum kloritin de sporisidal etkinliği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çizelge 2.9'da sporisidal ajan olarak kullanılması tavsiye edilen konsantrasyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.9 Bazı antibakteriyal ajanların sporisidal konsantrasyonları (Russell 1998)

Antibakteriyel ajan	**Sporisidal konsantrasyonu (%w/v)**
Setilpiridinyum klorür	>0,05
Klorhekzidin diasetat	>0,05
Klorokresol	>0,4
Krezol	0,3
Formaldehit	4,0-8,0
Gluteraldehit	2,0
Fenol	>5,0
Fenilmerkürik nitrat	>0,02
Sodyum hipoklorit	20 ppm

2.4.1.12 İyodin

İyot olarak da bilinen iyodin; tıpta tirdesin ile beraber dahili olarak, tentürdiyot ve benzeri iyot içerikli antiseptiklerde de harici olarak kullanılır. I_2 sembolü ile gösterilen elemental iyodin ikili atomik bir moleküldür. İyodin, kimyasal olarak klordan daha az reaktiftir ve organik madde varlığından klora göre daha az etkilenir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda iyot aktivitesi organik maddelerden çok az etkilenirken, düşük konsantrasyonların etkisi önemli ölçüde azalır. İyot, mikroorganizmaların hücre duvarına hızlıca nüfuz edebilir. Sitoplazmada bulunan tiyol gruplarıyla reaksiyona girer ve oksitler. Bu nedenle, ölümcül etkilerin protein nükleik asit yapılarının ve sentezlerinin bozulmasından kaynaklandığına kanaat getirilmektedir (Al- Adham vd. 2012).

2.5 Yerinde Temizlik Elemanları (Cleaning- In- Place) İle İlgili Genel Bilgiler

Gıda endüstrisinde ciddi problemlere sebep olan mikrobiyal biyofilmlerle mücadele etmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler:

1) Gıdaların temas ettiği yüzeylerin mekanik olarak temizlenmesi (fırçalama),
2) Çeşitli antimikrobiyal ajanların uygulanması,
3) Yüzeyler üzerinde nem ve besinsel artık bırakmadan mikroorganizmaların biyofilm geliştirmelerini engellemek,
4) Gıdaların işlendiği yüzyelerin fizikokimysal özelliklerini değiştirerek gıdanın işlendiği çevrede ya da gıdada bulunabilecek mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını fiziksel ve kimyasal değişikliklerle engellemek,
5) Uygun sanitasyon işlemlerinin uygulanması gibi yaklaşımları kapsamaktadır (Stewart vd. 2000).

Süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işletildiği sistemlerde; çiğ sütün içinde mevcut olan ısıya duyarlı, sütte ekşimeye sebep olan patojenik bakterileri yok etmek için, üretimin erken safhasında uygulanan pastörizasyon (72 °C, 15 s) özellikteki süreçleri uygulanmaktadır. Diğer işlem aşamaları (başlangıç kültürü ilavesi, kurutma, tuz ilavesi ve soğutma ile pH düşürülmesi), bu ısıl işlemden kurtulan termodurik bakterilerin gelişmesini sınırlandırmak için tasarlanmıştır (Flint 1997). Süt ve süt ürünleri üretim ve işletim tesislerinde kullanılan temizlik prosedürleri, esas olarak ucuz kimyasalların (kostik, asit ve klor) kullanımı ile sınırlıdır ve çoğu sterilizasyon uygulaması, 1900'lü yılların başlarından bu yana değişmemiştir. Temizlikteki en önemli gelişme, üretim tesislerinin daha küçük olduğu, süreçlerin daha az karmaşık olduğu ve şartnamelerin daha az katı olduğu, ilk olarak 1950'lerde ortaya çıkan yerinde temizlik (cleaning- in-place, CIP) sistemleridir (Romney 1990). Bu temizleme prosesi, ekipmanı sökme veya açma ihtiyacı olmadan ve hiç elle müdahaleye gerek kalmadan komple boru hattının temizlenmesi ile karakterizedir (Bremer vd. 2006). CIP, temizlik sıvılarının, tesiste bulunan makineler ve diğer ekipmanlar arasında dolaşımı olarak tanımlanabilir (Marchandt vd. 2012). Süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı işletim birimlerinde, termofilik basillerin varlıklarından kurtulmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.10 Süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı ekipman ve düzenekler de termofilik basillerin giderimi için kullanılan yaklaşımlar stratejiler (Gopal vd. 2015)

Yöntem	Uygulama
Fiziksel	Mekanik temizlik (fırçalama), Ultrasonikasyon
Kimyasal	Sürfaktanlar, organik madde bileşikleri, emülsiyon yapan ajanlar, Enzim ilavesi Asidik (HNO3.) ve alkalen (NaOH.) deterjanların kombinasyonları Oksitleyici ajanlar (hidrojen peroksit), klora dayalı ajanlar (sodyum hipoklorit), yüzey aktif bileşikler (kuaterner amonyum bileşikler vb.), iyodoforlar Moleküler ozon veya onun ayrışmış türevleri (hidroksil radikaller vb.)
Biyolojik	Enzimler (proteaz ve polisakkariti parçalayan enzimler vb.) ve bakteriyosinler (nisin, laktisin 3147 veya pediosin PA1 vb.) Enfekte bakterilere litik veya lizogenik yol aracılığı ile (fajlar)

Tipik yerinde temizlik aşamaları şu basamaklardan oluşur; 30 dakika boyunca 65 °C'de % 1 NaOH ve 30 dakika boyunca % 0,5 fosforik asit uygulaması. Kostik (alkali) yıkama, proteinler gibi organik maddeleri ortamdan uzaklaştırmak için uygulanırken, asit yıkaması ise tuz gibi inorganik maddelerin uzaklaştırılması için uygulanır. Süt endüstrisinde, kostik uygulamada kullanılan çözeltilerin, tesisin diğer ekipmanlarını temizlemek için yeniden kullanılması yaygın bir uygulamadır. Yeniden kullanım işlemin maliyetini düşürmesine rağmen, daha önce kullanılan çözelti içerisinden canlı durumda bulunan *Bacillus* türleri izole edilebilmiştir. (Swart 1995, Lindsay vd. 2002). Ancak, bu işlemlerde kullanılan kimyasal ajanların (kombine bir şekilde kostik solüsyon ve nitrik asit uygulaması) bazı termofilik basillerin oluşturdukları biyofilmleri giderdikleri görülmüştür (Parkar vd. 2004). Yerinde temizlik giderimlerinde kullanılan kimyasal ve enzimatik ajanların tavsiye edilen konsantrasyon değerlerinin altına inilmesi ya da uygulamasının yapıldığı sıcaklıklarının düşürülmesi, bu ajanların biyofilmlerinin giderme etkinliklerini ciddi ölçüde azaltmaktadır. Kostik ve asidik ajanların kombine bir şekilde uygulanmaları aynı zamanda sporisidal etkinlik de göstermektedir (Knight ve Weeks 2008, Seale 2009). Üretim tesislerinin yüzeylerinden ısıya dayanıklı streptokokların giderilmesi için, proteolitik enzim bazlı temizleme sistemlerinin kullanımı, bazı durumlarda alkali ve ardı sıra yapılan asit yıkamalarından daha etkili olabilmektedir (Flint vd. 1999). Ama, bu kimyasal karışımlar genellikle geleneksel kostik/nitrik asit temizleyicilerinden daha pahalıdır (Brooks ve Flint 2008).

Süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işlendiği tesislerde uygulanan rutin yerinde temizlik (CIP) döngüleri, tüm hücreleri etkin bir şekilde ortadan kaldıramaz (Flint 1998) ve kalan biyofilm hücreleri yüzeylere tekrar tutunarak veya daha önceden tutunmuş olan hücreler çoğalarak tekrar hızlı bir şekilde biyofilm oluşturmalarına sebep olur (Marshall 1994).

Süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı tesislerde bulunan ekipmanlarda oluşan termofilik biyofilmlerin kontrolü için, kimyasal olmayan giderim yollarından biri de ürünün işletildiği sıcaklıkları değiştirmektir. Örneğin; kremanın sütten ayrıştırıldığı santrifüj seperatölerinin sıcaklığını 15 ila 30 °C arasına çekmek, ürünün işletim süresini geciktirse de son aşamada termofilik basillerin oluşturdukları biyofilmi ve ürünün sahip olduğu termofilik basil yükünü önemli ölçüde azaltmaktadır. Bir diğer örnek de pastörizasyon işleminin yapıldığı ekipmanlar olan ısı değişim plakalarına uygulanan sıcaklıkların düşürülmesi, *Streptococcus thermophilus* biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır (Knight vd. 2004). Yine, başka bir çalışmada inkübasyon sıcaklığının 55 °C'den 48 °C'ye düşürülmesinin, *A. flavithermus* biyofilmleri içerisindeki sporulasyonunu ciddi düzeyde azalttığı görülmüştür. Termofilik basillerin gelişebileceği sıcaklıklarda buhar enjeksiyonu (DSI) gibi doğrudan temasa dayalı ısıtma sistemleri riski azaltacak şekilde sonuçlar vermiştir. Doğrudan buhar enjeksiyonu, sütün içerisine buharı doğrudan enjekte ederek, sütün çok hızlı bir şekilde ısıtılmasına imkân sağlamış ve termofilik basillerin gelişimini yavaşlatmış ya da tamamen engellemiştir (Refstrup 1998, 2000). Ancak, doğrudan buhar enjeksiyon sistemi, ısı değiştim plakaları gibi dolaylı ısıtma sistemlerine oranla oldukça maliyetlidir.

Çizelge 2.11 Tez kapsamında çalışılan kimyasal ve enzimatik ajanlar (Kılıç 2016)

Kimyasal – Enzimatik Ajan	Marka ve kodları	Literatürde uygulanan ajan miktarı	Tezde çalışılan miktar	Çözüldüğü tampon	Ortam sıcaklığı	Süre	Kaynak
Karbonhidratlara etki eden ajan							
Sodyum metaperiodat	Sigma 71859	50 mM	100 mM	dH_2O	22 ^oC	60 dk	Parkar vd. 2003
Makromolekülleri çöktüren ajan							
Trikloroasetik asit	Sigma 27242	% 10	% 10	dH_2O	100 ^oC	15 dk	Parkar vd. 2003
Hücre duvarı bütünlüğünü bozan ajan							
Lizozim	Sigma L-7651	% 2	% 2	10 mM Tris-HCl	37 ^oC	60 dk	Parkar vd. 2003
Proteinleri parçalayan ajan							
Sodyum dodesil sülfat Tripsin	Sigma L-5750 Sigma T2600000	% 2 % 2	% 3 % 3	dH_2O 50 mM Tris-HCl	100 ^oC 37 ^oC	10 dk 3 saat	Parkar vd. 2003 Parkar vd. 2003
Pro–oksidanlar							
Potasyum monopersülfat Sodyum tiyosülfat	Sigma 228036 Sigma 72049	1 mg/mL 9 mg/mL	2 mg/mL 10 mg/mL	SF dH_2O	22 ^oC 22 ^oC	30 dk 5 dk	Parkar vd. 2003
Antibakteriyel bakteriyosin ajan							
Nisin	Sigma N5764	1 mg/mL	2 mg/mL	0.02 N HCl	37 ^oC	24 saat	Boziaris ve Adams 1999
Enzime dayalı temizleyiciler							
a. Proteaz ajanları							
Alkalen proteaz Subtilizin*	Sigma P4860 Sigma P5380	% 0.08 % 0.5	0.16 U/g % 1	50 mM Glisin-NaOH 0.1 M Borat, 0.1 M $CaCl_2$	60 ^oC 37 ^oC	60 dk 30 dk	Parkar vd. 2004
b. Polisakkarit parçalayan ajanlar							
α-Amilaz* Selülaz*	Sigma A4551 Sigma C1184	% 0.5 % 0.3	% 1 % 1,66	20 mM Sodyum fosfat, 6.7 mM NaCl 50 mM Sodyum asetat	37 ^oC 37 ^oC	30 dk 30 dk	Parkar vd. 2004
Bakteriler arası iletişimi engelleyen ajanlar							
a. Sinyal reseptörleri inhibe edenler							
Furanon	Sigma 283754	1 mg/mL	1 mg/mL	dH_2O	22 ^oC	60 dk	Ponnusamy vd. 2010
b. Sinyal molekülü yapımını engelleyenler							
Triklosan	Sigma PHR1338	1 mg/mL	2 mg/mL	% 50 Etanol	22 ^oC	60 dk	Tabak vd. 2007

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez kapsamında kullanılan bakteri kültürleri ve gelişme koşulları

Yürütülen çalışmalarda kullanılan bakteriler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu' ndan temin edilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan izolatlar ve referas suşların listesi çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan izolatlar ve referans suşlar

Domain= Bacteria **Filum= *Firmicutes*** **Sınıf=*Bacilli*** **Takım= *Bacillales*** **Aile= *Bacillaceae***	
Koleksiyon Kodu	**Cins/ Tür Adı**
DSM 465^{T}	*Geobacillus thermodeniitrificans*
B84a	*Geobacillus thermoglucosidans*
DSM 2641^{T}	*Anoxybacillus flavithermus*
F81	*Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*

3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler ve tampon içerikleri

Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar Besiyeri içeriği

Triptik Soy Agar	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
(D+) Glukoz monohidrat	2,5 g	Merck 1.08342
K_2HPO_4	2,5 g	Sigma P8281
NaCl	5 g	Merck 1.06404
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH=7,3± 0,2		
İçerik 121 ºC'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.3 Standart Tam Yağlı Süt içeren besiyeri (%10'luk SKM-Skim Milk Medium)

Standart Tam Yağlı Süt	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Skim Milk	10 g	Sigma 7166
Distile su	900 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik 118 ºC'de 5 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.4 Medium I Agar besiyeri içeriği (Suzuki vd. 1976)

Medium I Agar	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Nişasta	10 g	Sigma S2004
Kazein pepton	5 g	Merck 1.07213
Yeast ekstrakt	3 g	Merck 1.03753
Meat ekstrakt	3 g	Merck 1.03979
K_2HPO_4	3 g	Sigma P8281
KH_2PO_4	1 g	Scharlau PO0260
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik 121 ºC'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.5 TBL besiyeri içeriği

TBL	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
K_2HPO_4	4,35 g	Sigma P8281
KH_2PO_4	3,4 g	Scharlau PO0260
Kazein Pepton	7,5 g	Merck 1.07213
(D+) Glukoz monohidrat	1 g	Merck 1.08342
Distile su	1000 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik 121 ºC'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.6 TBL besiyeri içeriği için kullanılan tuz çözeltisi

Tuz Solüsyonu	**5 mL/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
$MgSO_4.7H_2O$	2,46 gram/100 mL	Sigma 230391
$MnSO_4.H_2O$	0,04 gram/100 mL	Merck 5886
$ZnSO_4.7H_2O$	0,28 gram/100 mL	Scharlau CI0206
$FeSO_4.7H_2O$	0,4 gram/ 100 mL	Analar 0630120
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.7 TBL besiyeri içeriği için kullanılan Kalsiyum klorür çözeltisi

$CaCl_2$ Çözeltisi	**5mL/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
$CaCl_2.2H_2O$	3,66 gram/ 100 mL	Scharlau CA0193
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.8 DSM 1X besiyeri içeriği

DSM 1X	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Nütrient broth	8 g	Merck 1.05443
KCL	1 g	Sigma P9541
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g	Sigma 230391
Distile su	1000 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik 121 ºC'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.9 DSM 2X besiyeri içeriği

DSM 2X	**g/L**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Nütrient broth	16 g	Merck 1.05443
KCL	2 g	Sigma P9541
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g	Sigma 230391
Distile su	1000 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik 121 ºC'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.10 DSM 2X ve DSM 1X besiyerleri içeriği için kullanılan çözeltiler

1 M $Ca(NO_3)_2$ 0,1 M $MnCl_2.H_2O$ 1mM $FeSO_4$ %50 Glukoz çözeltisi	1 ml/L 1 ml/L 1 ml/L 2 ml/L
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.	

Çizelge 3.11 1 M $Ca(NO_3)_2$ çözelti içeriği

1 M $Ca(NO_3)_2$	10 mL (w/v)
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	2,3051 g
Distile Su	10 mL
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.	

Çizelge 3.12 0,1 M $MnCl_2.H_2O$ çözelti içeriği

0,1 M $MnCl_2.H_2O$	10 mL (w/v)
$MnCl_2.4H_2O$	0,1979 g
Distile Su	10 mL
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.	

Çizelge 3.13 1 mM $FeSO_4$ çözelti içeriği

1 mM $FeSO_4$	**50 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
$FeSO_4.7H_2O$ Distile Su	0,0139 g 50 mL	Analar 0630120
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.14 % 50'lik glukoz çözeltisi içeriği

%50 Glukoz	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Glukoz Distile Su	5 g 10 mL	Merck 1.08342
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.15 10 mM L-glutamik asit çözeltisi içeriği

10 mM L-glutamik asit	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
L- glutamik asit Distile Su	0,0147 g 10 mL	BDH 0338500
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.16 % 8'lık Glutaraldehit çözelti içeriği

% 8'lık Glutaraldehit	**10mL (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
% 25'lik Glutaraldehit dH_2O	3,2 mL 6,8 mL	Sigma G5882

Çizelge 3.17 % 2,4'lük Formaldehit çözeltisi içeriği

% 2,4'lük Formaldehit	**1 mL (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
% 37'lik Formaldehit dH_2O	64,86 µL 935,14 µL	Scharlau FO0012

Çizelge 3.18 % 12'lik Perasetik asit içeriği

% 12'lik Perasetik Asit	**1 mL (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
% 39'luk Perasetik Asit dH_2O	307 µL 693 µL	Sigma 77240

Çizelge 3.19 % 1'lik Setilpiridinyum klorür içeriği

Setilpiridinyum Klorür	**g/mL (w/)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Setlpiridiniyum Klorür	1 g	Sigms C0732
dH_2O	100 mL	

Çizelge 3.20 % 2'lik Klorokrezol içeriği

Klorokrezol	**g/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
4- kloro-3-metilfenol	0,202 g	Sigma C55402
(klorokrezol)	100 mL	
dH_2O		

Çizelge 3.21 % 2'lik Fenol içeriği

Fenol	**g/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Fenol	0,2 g	Merck 1.00206
dH_2O	10 mL	

Çizelge 3.22 600 ppm'lik Klorin dioksit içeriği

Klorin dioksit	**Ppm (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Klorin dioksit	12 µL	Sigma 514136-25X1G
dH_2O	10 mL	

Çizelge 3.23 % 1,5'luk m-krezol içeriği

m-krezol	**µL/mL (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
m-krezol	15 µL	Sigma C85727
dH_2O	10 mL	

Çizelge 3.24 1000 ppm'lik iyodin çözeltisi

İyodin	**Ppm (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
İyodin	0,01 g	Merck 1.04761
dH_2O	10 mL	

Çizelge 3.25 % 0,5'lik Klorhekzidin diasetat çözeltisi

Klorhekzidin diasetat	**g/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Klorhekzidin diasetat %100'lük etanol	0,05 g 10 mL	Sigma C6143

Çizelge 3.26 20 ppm'lik Sodyum hipoklorit çözeltisi

Sodyum Hipoklorit	**Ppm (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Sodyum Hipoklorit dH_2O	3,96 µL 10 mL	Sigma 425044

Çizelge 3.27 % 3'lük Nitrik asit içeriği

Nitrik Asit	**µL/mL (v/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
% 70'lik Nitrik asit dH_2O	45 µL 1 mL	Sigma 438073

Çizelge 3.28 10 mM Tris-HCl Tamponu

10 mM Tris-HCl	**100 mL**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Trisma Base dH_2O pH=8,0±0,2	0,12 g 100 mL	Sigma T6066
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.29 50 mM Tris-HCl tamponu

50 mM Tris-HCl	**100 mL**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Trisma Base dH_2O pH=8,0±0,2	0,61 g 100 mL	Sigma T6066
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.30 0,02 N HCl içeriği

0,02 N HCl	**100 mL**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
HCl (% 37'lik) dH_2O pH=4,0±0,2	0,167 mL 100 mL	Merck 1003172500

Çizelge 3.31 50 mM Sodyum Asetat tamponu

50 mM Sodyum Asetat	**50 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Sodyum asetat (3 Sulu) dH_2O pH=5,0±0,2	0,34 g 50 mL	Sigma 25022
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.32 Sodyum Fosfat- NaCl tamponu

Sodyum Fosfat- NaCl	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
20mM Sodyum fosfat dibazik 6,7 mM NaCl dH_2O pH=6,9±0,2	0,0284 g 0,0039 g 10 mL	Sigma S7907 Merck 1.06404
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.33 Borat- $CaCl_2$ tamponu

Borat- $CaCl_2$	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
0,1 M Borik Asit 0,1 $CaCl_2$ (3 Sulu) dH_2O pH=8,0±0,2	0,062 g 0,147 g 10 mL	Sigma B6768 Scharlau CA0193
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.34 50 mM Glisin- NaOH tamponu

50 mM Glisin- NaOH	**100 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Glisin dH_2O pH=9,0±0,2	0,375 g 100 mL	Sigma G-8898
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.35 Serum Fizyolojik

Serum Fizyolojik	**100 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
NaCl dH_2O pH=7,0±0,2	0,85 g 100 mL	Merck 1.06404
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.36 0,5 M NaCl çözeltisi

0,5 M NaCl	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
NaCl dH_2O	0,292 g 10 mL	Merck 1.06404
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.37 1 M NaCl çözeltisi

1 M NaCl çözeltisi	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
NaCl dH_2O	0,585 g 10 mL	Merck 1.06404
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.38 50 mM Sodyum metaperiodat çözeltisi

50 mM Sodyum metaperiodat	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Sodyum metaperiodat dH_2O	0,1074 g 10 mL	Sigma 71859

Çizelge 3.39 % 10'luk Trikloroasetik asit çözeltisi

% 10 Trikloroasetik asit çözeltisi	**g/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Trikloroasetik asit çözeltisi	1 g	Sigma 27242
dH_2O	100 mL	

Çizelge 3.40 % 3'lük Sodyum dodesil sülfat çözeltisi

% 3 Sodyum dodesil sülfat	**g/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Sodyum dodesil sülfat	3 g	Sigma L4390
dH_2O	100 mL	

Çizelge 3.41 2 mg/mL Potasyum monopersülfat çözeltisi

2 mg/mL Potasyum monopersülfat	**mg/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Potasyum monopersülfat	2 mg	Sigma 228036
Serum fizyolojik	1 mL	

Çizelge 3.42 10 mg/mL Sodyum tiyosülfat çözeltisi

10 mg/mL Sodyum tiyosülfat	**mg/mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Sodyum tiyosülfat	10 mg	Sigma 72049
dH_2O	1 mL	

Çizelge 3.43 % 2'lik Lizozim çözeltisi

% 2'lik Lizozim	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Lizozim	0,2 g	Sigma L6876
10 mM Tris- HCl	10 mL	

Çizelge 3.44 % 2'lik Tripsin çözeltisi

% 2'lik Tripsin	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Tripsin	0,2 gram	GIBCO Trypsin (1:250)- 27250018
50 mM Tris- HCl	10 mL	

Çizelge 3.45 2 mg/mL'lik Nisin çözeltisi

2mg/mL Nisin	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Nisin 0,02 HCl	0,02 g 10 mL	Sigma N5764

Çizelge 3.46 % 1'lik Subtilizin çözeltisi

% 1'lik Subtilizin	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Subtilizin 0,1 M Borat- 0,1 M $CaCl_2$	0,1 gram 10 mL	Sigma P5380

Çizelge 3.47 0,16 U/g Alkalen Proteaz çözeltisi

0,16 U/g Alkalen Proteaz	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Alkalen Proteaz 50 mM Glisin- NaOH	0,67 mL 9,33 mL	Sigma P4860

Çizelge 3.48 % 1'lik α- Amilaz çözeltisi

% 1'lik α- Amilaz	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
α- Amilaz 20 mM Sodyum fosfat- 6,7 mM NaCl	0,1 g 10 mL	Sigma A4551

Çizelge 3.49 % 1,66'lık Selülaz çözeltisi

% 1,66 'lık Selülaz	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Selülaz 50 mM Sodyum asetat tamponu	0,166 g 10 mL	Sigma C1184

Çizelge 3.50 1 mg/mL Furanon çözeltisi

1 mg/mL Furanon	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Furanon dH_2O	0,01 g 10 mL	Sigma 283754

Çizelge 3.51 2 mg/mL Triklosan çözeltisi

2 mg/mL Triklosan	**10 mL(w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Triklosan %50'lik etanol	0,02 g 10 mL	Fluka LRAA1072

Çizelge 3.52 % 0,001'lik Akridin oranj çözeltisi

% 0,001'lik Akridin oranj	**10 mL (w/v)**	**Kimyasal Marka ve Kodları**
Akridin oranj Distile su	1 µg 10 mL	Sigma 235474

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin kültürlerinin hazırlanması

-86 °C'de gliserol stoklarında bulunan suşlar öncelikle MI (Medium 1) katı besiyerine inoküle edilmiş olup, bakteriler gelişebildiği optimum sıcaklık olan 55 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Bu kısımdan sonra tüm biyofilm üretimlerinden önce mutlak surette aşağıda bahsedilen ön aktifleştirme basamakları uygulanmıştır. 24 saat sonunda gelişen koloniler toplanmış olup, NaCl katkılı 3 mL'lik TSB sıvı besi yerlerine inoküle edilmiştir ve tekrar 55 °C'de 18 saat boyunca çalkalamalı (170 rpm/dk) olarak inkübasyona bırakılmıştır. 18 saatin sonunda aktif sıvı kültürden % 4 oranında NaCl'siz 5 mL' lik TSB'ye aşılanarak 6 saat boyunca 55 °C'de çalkalamalı koşullarda (170 rpm/dk) inkübasyona bırakılmıştır. İlgili inokülasyon işlemi, çalışılacak bakterilerin, biyofilm çalışmalarından önce sporulasyon fazına geçmelerini engelleyerek vejetatif hücre şeklindeki aktif yaşam formunda kalmalarını sağlamak amacıyla uygulanmıştır (Kilic vd 2017). Spor üretimi için kullanılan aktif kültürün ön inkübasyon süresi ise, kültür biyofilm üretimi için kullanılmadığından 18 saat ile sınırlı tutulmuştur.

3.2.2 Bakterilerin azami seviyede spor ürettikleri besiyerlerinin belirlenmesi

Tez kapsamında çalışılan 4 farklı termofilik basilin daha ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere öncelikle sporlandırılmıştır. Sporulasyon oranlarının araştırılmasına yönelik denemeler, bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan üç farklı besiyeri ve iyon konsantrasyonu ihtiva eden ortamlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerine ek olarak Donellan, Nags ve Levinson (1964)'un uyguladığı sporulasyon besiyeri içerisindeki L-glutamik asit konsantrasyonu baz alınmış ve diğer iyon içeriklerine uygun olarak bu üç besiyerine ayrıca ilave edilmiştir. Üç besiyeri içinde hazırlanan tuz çözeltileri filtre ile sterile edildikten sonra ve otoklavlanan besiyerlerine ayrıca ilave edilmiştir.

Hazırlanan besiyerleri 5 mL olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Test edilen sporulasyon besiyerlerinin olası 12 kombinasyonu çizelge 3.53'te gösterildiği şekliyle düzenlenmiştir.

Çizelge 3.53 Kullanılan besiyerleri ve ihtiva ettikleri iyon ve şekerlere göre kombinasyonları

TBL
TBL+ Dekstroz
TBL+ L- glutamik asit
TBL+ Dekstroz +L- glutamik asit
DSM 1X
DSM 1X + Dekstroz
DSM 1X +L- glutamik asit
DSM 1X+ Dekstroz + L- glutamik asit
DSM 2X
DSM 2X + Dekstroz
DSM 2X +L- glutamik asit
DSM 2X+ Dekstroz + L- glutamik asit

18 saatlik aktif kültürlerden koloniler toplandıktan sonra, 5 mL serum fizyolojik içerisinde OD=0,2 oranında bulanıklık elde edilecek şekilde süspanse edilmiştir. Hazırlanan bu aktif kültürlerden 200' er µL 5 mL besiyeri içeren tüplere (% 4 inokülüm oranında) inoküle edilmiştir. İnokülüm sonrası besiyerleri, suşların optimum gelişme gösterdikleri 55 °C sıcaklıkta ve çalkalamalı (170 rpm) koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saat sonrasında, bulanıklaşan kültürlerden, bir seri dilüsyon yapılarak, toplam hücre sayısı damla plak ekim yöntemi ile kob/mL cinsinden belirlenmiştir. Spor sayımı ise, vejetatif hücreleri ortamdan uzaklaştırmak adına 15 dakika boyunca kaynatma işlemine tabi tutulduktan sonra yine bir seri dilüsyon yapılarak, damla plak ekim yöntemi ile kob/ mL cinsinden hesaplanarak yapılmıştır. mL başına düşen koloni oluşturan birim; "[Koloni Sayısı/ Dilüsyon Faktörü (10^{-x})] / İnoküle Edilen Hacim" formülü esas alınarak hesaplanmıştır.

Her bir bakterinin test edilen 24-48 saatlik 12 besiyeri kombinasyonundaki sporulasyon oranları faz- kontrast mikroskopisi ile de incelenmiştir. Ayrıca, 24 ve 48 saat sonrasında her bir besiyerindeki kültürde mikrobiyal gelişimi tespit etmek amacıyla kültürlerin bulanıklığı OD_{595} nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Sonuç olarak, tez kapsamında çalışılan *G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermoglucosidans* B84a, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 suşlarının en iyi sporlanma oranları gösterdikleri kombinasyonlar seçilmiştir. Seçilen besiyeri kombinasyonları 2 litre hazırlanarak, sporlanma oranlarını arttırma amaçlı sporulasyon besiyerlerine aşılanmış ve tekrar 55 °C'de çalkalamalı koşullarda (170 rpm/dk) 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda sporlar hasat edilmiştir.

3.2.3 Bakteri sporlarının saflaştırılması

48 saatin sonunda gelişen sporları besiyerinden uzaklaştırmak adına 6000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve oluşan pellet steril 5 mL soğuk serum fizyolojikte süspanse edilmiştir. Vejetatif hücreleri uzaklaştırmak amacıyla ilk olarak 15 dakika boyunca örnekler

kaynatılmış daha sonra 40 amplitude 30 saniye boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemlerden sonra örnek 6000 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi 5 mL serum fizyolojik içerisinde pellet süspanse edilerek ve ardından tekrar santrifüjlenerek iki kez tekrarlanmıştır. Yıkanan pellet, 1,5 mL serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiştir. İşlemlerden geriye kalan vejetatif hücreleri ve parçalanma sonucu oluşan hücre kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla % 55' lik sükroz çözeltisinin üzerinde ince bir tabaka oluşacak şekilde örnek eklenmiş ve 4000' rpm de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Edwards ve Shonna 2016). Pellet, daha sonra sükroz kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla tekrar serum fizyolojik ile yıkanmış ve 6000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Son olarak pellet 1 mL serum fizyolojikte süspanse edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de bekletilmiştir (Wiencek vd. 1990).

3.2.4 Saflaştırılan sporların 6 farklı abiyotik yüzeyde adhezif özelliklerinin belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan yüzeyler; paslanmaz çelik, polikarbonat, teflon, kauçuk, polipropilen, polivinil klorürdür (r: 7 mm, kalınlık: 1 mm, toplam yüzey alanı: 3,08 cm^2). Çalışma öncesi kuponlar ilk olarak deterjanlı su ile fırçalanarak temizlenmiştir. Bol suyla durulanan yüzeyler organik kalıntı kalma ihtimaline karşı izoproponal ile muamele edilmiştir. İzoproponal muamelesi sonrası tekrar bol suyla yıkanan yüzeyler tek tek sıkıca alüminyum folyo ile paketlenerek 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanma işlemine tabi tutularak steril edilmiştir.

Hazırlanan termofilik basil sporlarının ideal 6 farklı abiyotik yüzeyde (paslanmaz çelik, polikarbonat, polivinilklorür, polipropilen, teflon ve kauçuk) adhezif özelliklerini belirlemek amacıyla ilk önce her bakterinin spor stokları 10^7 spor/mL'ye seyreltilerek eşit konsantrasyona getirilmiştir. Yüzeylerin her iki yönünün eşit derecede spor süspansiyonuna tabi tutulması amacıyla 50 mL'lik steril falkonlar kullanılmıştır. Yüzeyler, 30 dakika boyunca spor süspansiyonu içerisinde oda koşullarında inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda yüzeyler spor süspansiyonları içerisinden alınıp, yüzeye tutunmayan sporları uzaklaştırmak amacı ile serum fizyolojik ile bir defa yıkanmıştır.

İşlem iki paralel olacak şekilde yapılmış olup, bir paraleli epifloresan mikroskobu görüntüleri için, diğer paraleli ise tutunan sporların sayımları için kullanılmıştır. Epifloresan mikroskobu için ayrılan yüzeyler, oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda % 0,001 konsantrasyonundaki floresan özellikli akridin oranj çözeltisi ile 3 dakika boyunca muamele edilmiştir. 3 dakika sonunda her bir yüzey 3 defa serum fizyolojik ile yıkanarak fazla tutunan boyanın giderilmesi sağlanmıştır. Boyalı yüzeyler, Zeiss Microscope MTB 2004 model Epiflorean mikroskobunda 20X büyütmeli objektifle görüntülenmiş ve Zeiss Axiocam MRc5 kamera ve AxioVision Release 4.3 (11-2004) yazılım programı yardımıyla fotoğraflanarak, görüntüler dijital ortamda kaydedilmiştir. Yedi mm yarı çapındaki her yüzeyden en az 5-6 alana ait görüntü alınmıştır. Ayrıca, mikroskopik olarak incelenen her yüzeyin paralel örnekleriyle spor sayım işlemleri $\log_{10}$ kob/mL'ye çevrilerek verilmiştir. Bunun dışında 3 paralel olarak yürütülen bu deneylerde, hiç sporla muamele edilmemiş steril kuponlar negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5 Sporisidal ajanların sporlar üzerindeki etkinliklerinin belirlenmesi

Tez çalışması dahilinde dezenfektan özellikli 12 adet sporisidal ajan kullanılmıştır. Bu ajanların önceki çalışmalar ile tez çalışmasında uygulanan konsantrasyonları çizelge 3.54'te sunulmuştur.

Çizelge 3.54 Çalışma dahilinde uygulanan sporisidal ajanlar

Sporisidal Ajanlar	Literatürde Uygulanan Konsantrasyon miktarı	Çalışmada Uygulanan Konsantrasyon Miktarları	Kaynak
Klorokrezol (4-chloro-3-methylphenol)	%0,4 (w/v)	%0,4, %0,8, %1,2	Russell 1990
Krezol (m-cresol)	%0,5	%0,5, %1,0, %1,5	Russell 1990
Fenol	%0,5	%0,5, %1, 0, %1,5	Russell 1990
Klorhekzidin diasetat	%0,05	%0,05, %0,1, %0,15	Russell 1990
Setilpridinyum klorit	%0,05	%0,05, %0,1, %0,15	Russell 1990
Gluteraldehit	%2,0	%2, %4, %6	Russell 1990
Formaldehit	%4-8	%0,8, %1,6, %2,4	Russell 1990
Hipoklorit	20 ppm	20 ppm, 40 ppm, 60 ppm	Russell 1990
Nitrik Asit (HNO_3)	%1,0	%1, %2, %3	Marchand vd. 2012
İyodin	12,5-25,0 ppm	12,5 ppm, 25 ppm, 37,5 ppm	Rossmoore 1995
Perasetik asit	%4,0-15,0	%4, %8, %12	Rossmoore 1995
Klorin dioksit	100-200 ppm	200 ppm, 400ppm, 600 ppm	Rossmoore 1995

Kimyasallarla muameleden önce, spor konsantrasyonları dilüsyon işlemi ile eşit konsantrasyonlara getirilmiştir (10^7 spor/mL). Kimyasalların etkinlikleri, steril U tabanlı 96 kuyulu polistiren mikrotitre plakalarda, tavsiye edilen konsantrasyonlar başta olmak üzere üç farklı konsantrasyonda test edilmiştir. Kimyasallardan 100'er µL eklenmiş ve daha sonrasında hazırlanan spor stoklarından 10'ar µL kuyulara aşılanmıştır. Böylelikle reaksiyon karışımındaki spor konsantrasyonu 10^5 spor/mL olmuştur, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakikalık her bir temas süresi test edilmiştir. Temas süresi sonunda reaksiyon karışımından 10 µL alınarak, TSA besiyerine yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 55 °C sıcaklıkta 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve sürelerin sonunda gelişen koloniler sayılarak, Bölüm 3.2.2'de anlatılan şekilde mL başına düşen koloni oluşturma birim hesaplanmış ve $\log_{10}$ tabanına çevrilmiştir. Elde edilen logaritmik koloni oluşturma birimleri esas alınarak başlangıç spor konsantrasyonuna göre olan (10^5) logaritmik azalma (LR; log reduction) belirlenmiştir. Logartimik yüzde azalma sonuçları ise; $(1\text{-}10^{-LR})$ x100 formülüne göre hesaplanmıştır

3.2.5.1 Sporisidal ajanlar arasından en etkili olan ikisinin LD_{50} değerlerinin hesaplaması

Bölüm 3.2.4' te yapılan denemelerin sonuçlarına dayanılarak seçilen iki adet kimyasal ajanın (perasetik asit ve nitrik asit) ilk olarak etkin madde konsantrasyonları belirlenmiş ve ikili kombinasyonları denenmiştir. Tez kapsamında çalışılan 4 bakteri içerisinden referans suş olan *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in sporisidal ajanlara gösterdikleri direnç göz önüne alınarak, kimyasalların ikili kombinasyonlarının etkisi bu iki suş üzerinde denenmiştir.

İlk olarak nitrik asitin ve perasetik asitin ardışık sıra etkinliklerini belirlemek amacıyla, 96 kuyulu polisitren mikrotitre plakalara, her iki suş için 100'er µL % 4'lük perasetik asit çözeltisi ve üzerine konsantrasyonu 10^7'ye seyreltilen 10 µL spor stoklarından ilave edilmiştir. Daha sonra 10 dakika oda koşullarında (22 °C) inkübe edilmişlerdir. Süre bitiminde kuyulara % 3'lük nitrik asit çözeltisinden 100 µL ilave edilmiş ve tekrar oda koşullarında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kuyulardan alınan karışım bir seri dilüsyona tabi tutularak TSA besiyerine yayma plaka tekniğiyle inoküle edilmiştir.

Petriler 55 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılarak, süre bitimi sonucunda gelişen koloniler sayılmıştır.

Nitrik asitin ve perasetik asitin etkinliklerini birarada değerlendirmek adına ilk olarak her iki asit çözeltisinin de ideal giderim konsantrasyonları için etken madde miktarları hesaplanmıştır [(Nitrik asit % 3,0 solüsyonu; 100 µL reaksiyon karışımı içerisindeki miktarı: 4239 µg), (Perasetik asit % 4,0'lük solüsyonu; 100 µL reaksiyon karışımı içerisindeki miktarı: 4600 µg)]. Daha sonra Çizelge 3.55' te gösterildiği üzere bir seri dilüsyon uygulanmıştır. 10^7'ye seyreltilen spor stokları her bir kuyuya 10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Nitrik asit için 30 dakika, perasetik asit için 10 dakika temas süresi uygulanmıştır. Süre bitiminde kuyu içeriğinden alınan karışım yine dilüsyon sonunda TSA besiyerine yayma plaka yöntemi ile inoküle edilmiştir. Petriler 55 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılarak, petrilerde gelişen koloniler sayılmıştır.

Çizelge 3.55 Deney düzeneğinde kullanılan nitrik asit ve perasetik asit konsantrasyonları

	1	**1/2**	**1/4**	**1/8**	**1/16**	**1/32**	**1/64**	**1/128**
Nitrik asit (µg)	4239 (% 3,0)	2119,5	1059,75	529,88	264,94	132,47	66,23	33,12
Perasetik asit (µg)	4600 (% 4,0)	2300	1150	575	287,5	143,75	71,88	35,94

3.2.5.2 Nitrik asit ve Perasetik asit için belirlenen LD_{50} değerlerine göre asitlerin ikili kombinasyonlarının etkinliklerinin belirlenmesi

Nitrik asit ve perasetik asit çözeltisinin Bölüm 3.2.4.1'de belirlenen LD_{50} konsantrasyonları ve 2^1-2^7'lik katları kullanılarak ikili kombinasyonları (Nitrik asit-perasetik asit; 1:1, 1:2; 2:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1'lik bir oran her bir oran etken maddenin LD_{50} değerinin katlarına tekabül etmektedir) *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *A. flavithermus* DSM 2641^T'in spor stokları üzerinde denenmiştir. Deney düzeneği 96 kuyulu polisitren mikrotitre plakalarda kurulmuştur. Her bir kuyuya sırasıyla oranları 1:1, 1:2; 2:1, 1:3, 3:1, 1:4 ve 4:1 olacak şekilde nitrik asit ve perasetik asit çözeltilerinden ilave edilmiştir. Oluşan karışım üzerine ise daha önceki deney düzeneklerindeki gibi 10^7'ye seyreltilmiş spor stoklarından ilave edilmiş ve böylelikle

mikrotitre plakadaki tek bir kuyu içerisinde bulunan spor konsantrasyonu 10^5'e seyreltilmiştir. Temas süresi her iki asiti de kapsayacak şekilde 30 dakika olarak belirlenmiş olup, deney düzeneği oda koşullarında (22 °C) gerçekleştirilmiştir. Temas süresi sonunda karışımdan alınan örnek bir seri dilüsyon sonrası yayma plaka tekniğiyle TSA besiyerine inoküle edilmiştir. Petriler 55 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılarak ve Bölüm 3.2.5'te anlatılan formülasyona göre logaritmik yüzde azalma oranları hesaplanarak kimyasallar arasındaki etkileşimler incelenmiştir.

3.2.6 Biyofilm sistemlerindeki sporların ve planktonik fazdaki sporların ısıl inaktivasyon kinetiklerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması

Tez kapsamında çalışılan termofilik basillerin biyofilm yapılarındaki ve daha önce üretilip saflaştırılan planktonik fazdaki sporlarının termal adaptasyon yeteneklerini belirlemek amacıyla, örneklere 30 dakika ve 60 dakika boyunca 100 °C'de kaynatma, 118 °C'de 15 dakika otoklavlama, 121 °C'de 15 dakika otoklavlama, kuru ısı bloğunda 135 °C ve 145 °C 'de, 1, 5, 15, 30 ve 60 dakika bekletme gibi farklı sıcaklık uygulamaları denenmiştir.

Planktonik fazdaki sporlar, öncelikle spor stokları 1mL'de 10^7 konsantrasyonda olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilmiştir. Her bir sıcaklık uygulaması sonrası, karışım bir seri dilüsyona tabii tutularak damla plak yöntemi ile TSA besiyerine inoküle edilip, petriler 55 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler sayılmıştır.

Süt ve süt ürünleri endüstrisinde en sık kullanılan yüzey olduğu için biyofilm geliştirilmesi 316L tipi (En: 0,8 cm x Boy: 2,5 cm x Kalınlık: 0,1 cm) dikdörtgen şeklindeki paslanmaz çelik kuponlar üzerinde yapılmıştır. Biyofilm üretimi için 6 kuyulu polisitren mikrotitre plakalar kullanılmış olup, her kuyuya iki paslanmaz çelik kupon yerleştirilmiştir. Her kuyuya 5 mL % 10'luk SKM besiyeri ve 200 µL aktif kültür ilave edildikten sonra hazırlanan deney düzeneği 60 °C sıcaklıkta 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, yüzeyler steril ortamda besiyerlerinden

uzaklaştırılıp, planktonik durumdaki hücre ve sporların uzaklaştırılması için bir kez serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Sıcaklık uygulaması yapılmayan bir set yüzey, kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra, farklı sıcaklıkların uygulanacağı yüzeyler 4,5 mL serum fizyolojik içeren steril tüplere transfer edilmiştir. Sıcaklık uygulamalarından sonra paslanmaz çelik yüzeyler, üzerinde ki biyofilm yapısını kaldırmak amacı ile steril 4,5 mL serum fizyolojik ve 10 gram cam boncuk içeren falkon içerisine taşınmış ve en yüksek devirde vortekslenmiştir. Oluşan süspansiyondan bir seri dilüsyon yapılmıştır ve TSA besiyerine damla plaka uygulaması ile inoküle edilerek 55 °C de 18 saat boyunca inkübasyona kaldırılmıştır. Süre bitiminde gelişen koloniler sayılmıştır.

Sıcaklık uygulamalarından sadece kuru ısı bloğunda uygulanan seri sonrasında ek olarak biyofilm içerisindeki spor miktarını belirlemek amacı ile 15 dakika süresince kaynatma işlemine tabi tutulmuştur.

Koloni oluşturma birimlerinin hesaplaması Bölüm 3.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen koloni oluşturma birimleri, kullanılan kuponların alanlarına (2 cm^2) bölünerek, cm^2'ye düşen koloni miktarı hesaplanmıştır.

3.2.7 Statik koşullarda biyofilm örneklemesi ve örneklenen biyofilmlere giderim ajanlarının uygulanması

Bakterilerin biyofilm üretimi öncesi ön aktifleştirilmesi, Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekliyle yapılmıştır. Daha önceki çalışmalardan alınan sonuçlara göre 4 adet termofilik basilin, en iyi biyofilm ürettiği yüzeyler tespit edilmiş ve çizelge 3.56'da belirtildiği şekliyle bu çalışma kapsamına dahil edilmiştir (Karaca 2018).

Çizelge 3.56 Termofilik basillerin ideal düzeyde biyofilm ürettiği yüzeyler

Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	
Polikarbonat	Polivinil klorür
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	
Polipropilen	Paslanmaz Çelik
Geobacillus thermodeniitrificans DSM 465^{T}	
Polikarbonat	Paslanmaz Çelik
Geobacillus thermoglucosidans B84a	
Polikarbonat	Paslanmaz Çelik

Belirlenen yüzeylerde biyofilm üretimi 6 kuyulu polistiren mikrotitre plakalarda, her kuyuda iki özdeş yüzey olacak şekilde yapılmıştır. Her bir bakteri için iki yüzey üzerine % 4 oranında aktif kültür ilave edilmiş, ilk tutunmaya fırsat sağlanması açısından en az 5 dakika süresince beklenilmiştir. Daha sonra her kuyuya 5'er mL steril % 10'luk SKM eklenmiştir. Deney düzeneği 60 °C sıcaklıkta 24 saat boyunca sürdürülmüştür. 24 saat sonunda yüzeyler alınarak, yeni ve steril 6 kuyulu polistiren mikrotitre plakalara aseptik koşullarda ters yüz edilerek taşınmış ve tekrar % 4 oranında aktif kültür inokülümü yapılarak her kuyuya 5'er mL % 10'luk steril SKM eklenmiştir. İkinci 24 saatlik inkübasyona yine 60 °C'de devam edilmiştir. 48 saatin sonunda yüzeyler kuyulardan alınarak, planktonik fazdaki hücreleri uzaklaştırmak amacıyla bir kere serum fizyolojikte yıkanılmıştır. Sonrasında Çizelge 3.57'de gösterilmiş olan giderim ajanları, uygulama süreleri, konsantrasyonları ve reaksiyon sıcaklıklara uygun olarak kuponlarla muamele edilerek giderim çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 3.57 Çalışma dahilinde kullanılan enzimatik ve kimyasal giderim ajanları

Kimyasal-Enjimatik Ajan	**Literatürde uygulanan ajan miktarı**	**Tezde çalışılan miktar**	**Çözüldüğü tampon**	**Ortam sıcaklığı**	**Süre**	**Kaynak**
Sodyum metaperiodat	50 mM	100 mM	dH_2O	22°C	60 dk	Parkar vd. 2003
Trikloroasetik asit	%10	%10	dH_2O	100°C	15 dk	Parkar vd. 2003
Lizozim	%2	%2	10 mM Tris-HCl	37°C	60 dk	Parkar vd. 2003
Sodyum Dodesil Sülfat	%2	%3	dH_2O	100°C	10 dk	Parkar vd. 2003
Tripsin	%2	%2	50 mM Tris-HCl	37°C	3 saat	Parkar vd. 2003
Potasyum mono persülfat*	1 mg/mL	2 mg/mL	SF	22°C	30 dk	Parkar vd. 2003
Sodyum tiyosülfat*	9 mg/mL	10 mg/mL	dH_2O	22 ^oC	5 dk	
Nisin	1 mg/mL	2 mg/mL	0.02 N HCl	37 ^oC	24 saat	Boziaris ve Adams 1999
Alkalen proteaz	%0.08	0.16 U/g	50 mM Glisin-NaOH	60°C	60 dk	Parkar vd. 2004
Subtilizin	%0,5	%1	0.1 M Borat, 0.1 M $CaCl_2$	37 ^oC	30 dk	Parkar vd. 2004
α-Amilaz	%0,5	%1	20 mM Sodyum fosfat, 6.7 mM NaCl	37 ^oC	30 dk	Parkar vd. 2004
Selülaz	%0,3	%1,66	50 mM Sodyum asetat	37 ^oC	30 dk	Parkar vd. 2004
Furanon	1 mg/mL	1 mg/mL	dH_2O	22 ^oC	60 dk	Ponnusamy vd. 2010
Triklosan	1 mg/mL	2 mg/mL	%50 Etanol	22 ^oC	60 dk	Tabak vd. 2007
NaCl solüsyonu	0,5 M- 1M	0,5 M- 1M	dH_2O	22 ^oC	30 dk	Parkar vd. 2003

* Potasyum monopersülfatın nötralize edici ajanı sodyum tiyosülfat olduğu için iki ajan aynı ortamda ve ardı sıra olacak şekilde kullanılmıştır

Giderim ajanları ve enzimler belirtilen süre ve sıcaklıklarda uygulandıktan sonra, yüzey üzerinde kalan kimyasalları gidermek amacıyla, yüzeyler bir defa serum fizyolojikle yıkanmıştır. Daha sonra biyofilm tabakasını kaldırmak için yüzeyler, steril 50 mL'lik 10 gram ağırlığında cam boncuk içeren falkonlara alınmış ve üzerlerine 4,5 mL serum fizyolojik ilave edilerek yüksek devirde vortekslenmiştir. Oluşan süspansiyondan bir seri dilüsyon hazırlanarak, damla plaka ekim yöntemi ile toplam hücre sayısı kob/mL şeklinde belirlenmiştir. Spor sayımı için ise, yüzeylerin kazınması sonucu oluşan süspansiyon 15 dakika süresince kaynatılarak vejetatif hücrelerden uzaklaştırılmış ve

yine seri dilüsyon sonrası damla plaka ekim yöntemi yapılmıştır. Giderim oranlarını belirlemek için öncelikle, "koloni oluşturma birimleri/cm^2" formülü esas alınarak cm^2'ye düşen koloni miktarı hesaplandıktan sonra, kontrol grupları esas alınarak Bölüm 3.2.5'de anlatılan LR (log reduction) hesaplaması yapılmıştır. Böylelikle kullanılan kimyasalların ve enzimlerin giderim oranları bulunmuştur.

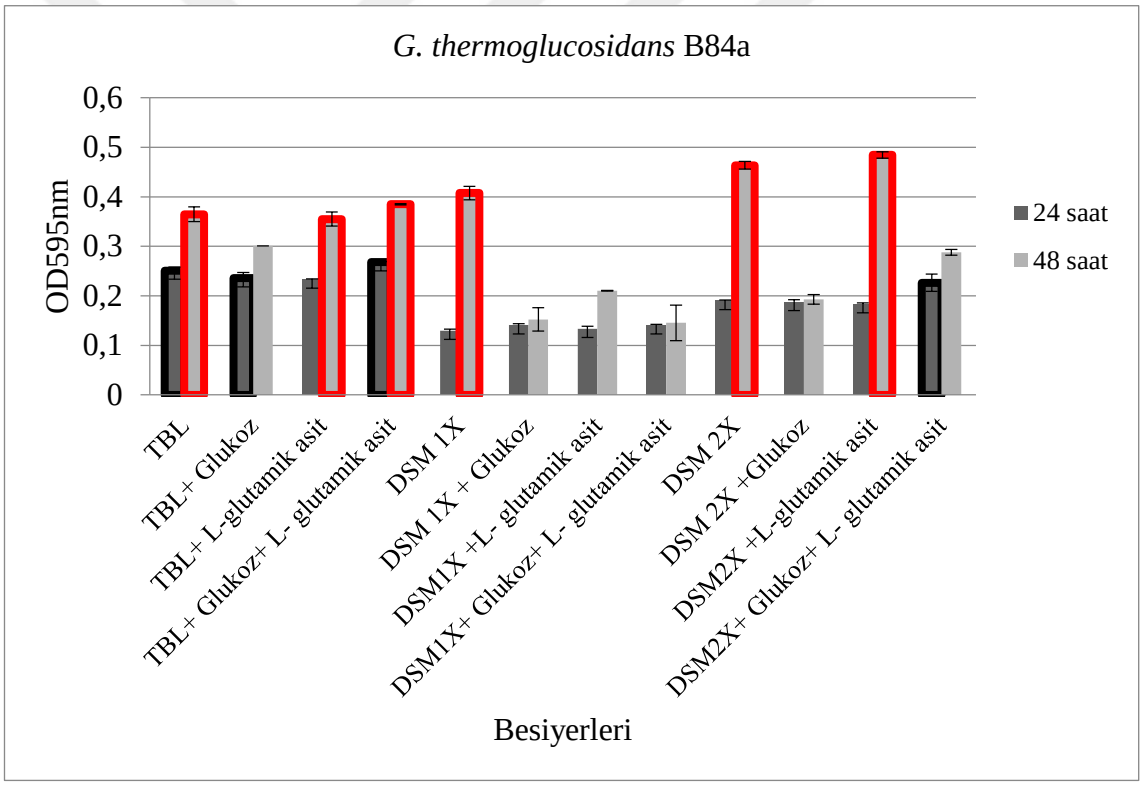
3.2.8 İstatistik analizler

Deney sonuçlarından elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 22.0 programı ile yapılmış ve optimum sporulasyon besiyerlerinin seçilmesinde, "Tukey testi, Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi ve Games-Howell karşılaştırması" yapılmıştır. Ayrıca sporisidal ajanların LD_{50} değerlerinin bulunmasında "Probit Analizi" uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 En İdeal Mikrobiyal Gelişim ve Sporulasyon Gözlenen Besiyerinin Seçimi

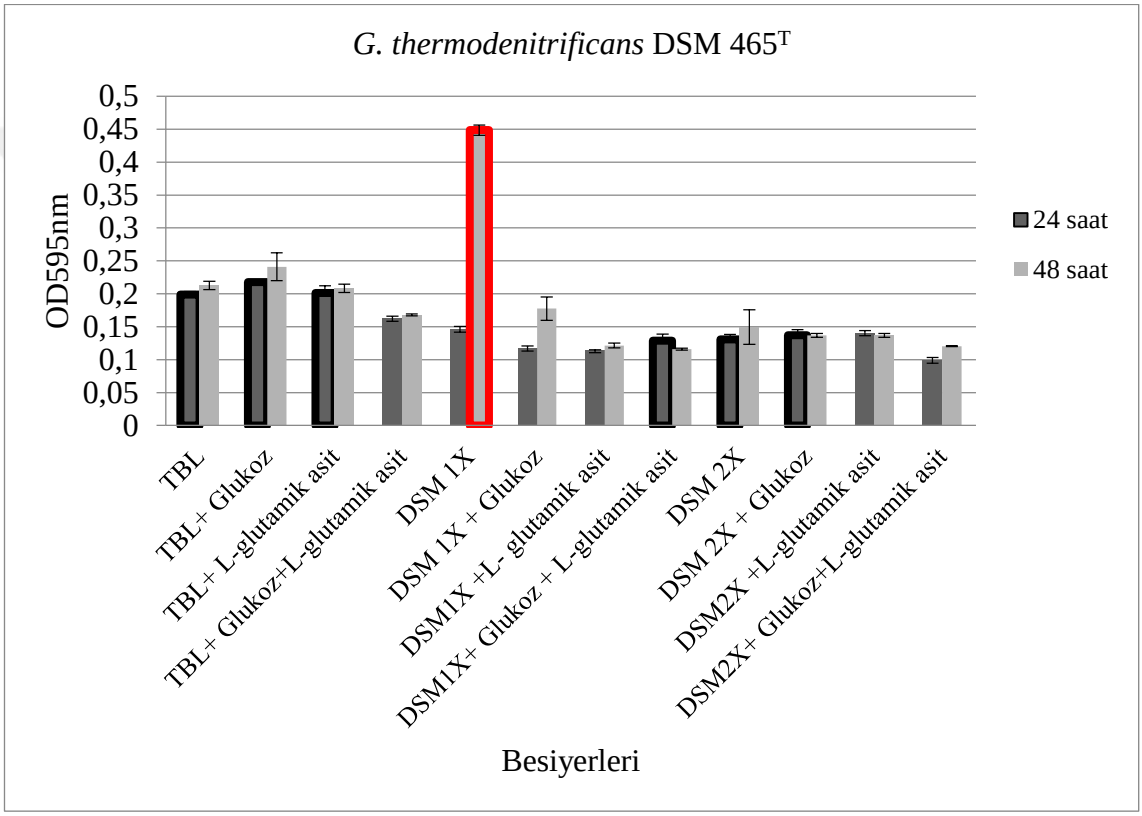
Tez kapsamında çalışılan 4 farklı termofilik basilin en iyi spor ürettiği ve aynı zamanda en iyi mikrobiyal gelişim gösterdiği besiyeri içeriğinde tespit etmek amacıyla yürütülen deneyler Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Buna göre B84a, DSM 465^{T}, F81 ve DSM 2641^{T}'in 12 farklı sporulasyon besiyerinde 24- 48 saat süresince spektrofotometrik olarak ölçülen mikrobiyal gelişimlerine ait sonuçlar şekil 4.1-4.4 arasındaki grafiklerle sunulmuştur.



Şekil 4.1 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi

B84a'nın 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyerleri sırasıyla; TBL, TBL + Glukoz, TBL + Glukoz + L-glutamik asit ve DSM2X + Glukoz + L-glutamik asit olarak saptanmıştır (Şekil 4.1). Ortalamalar

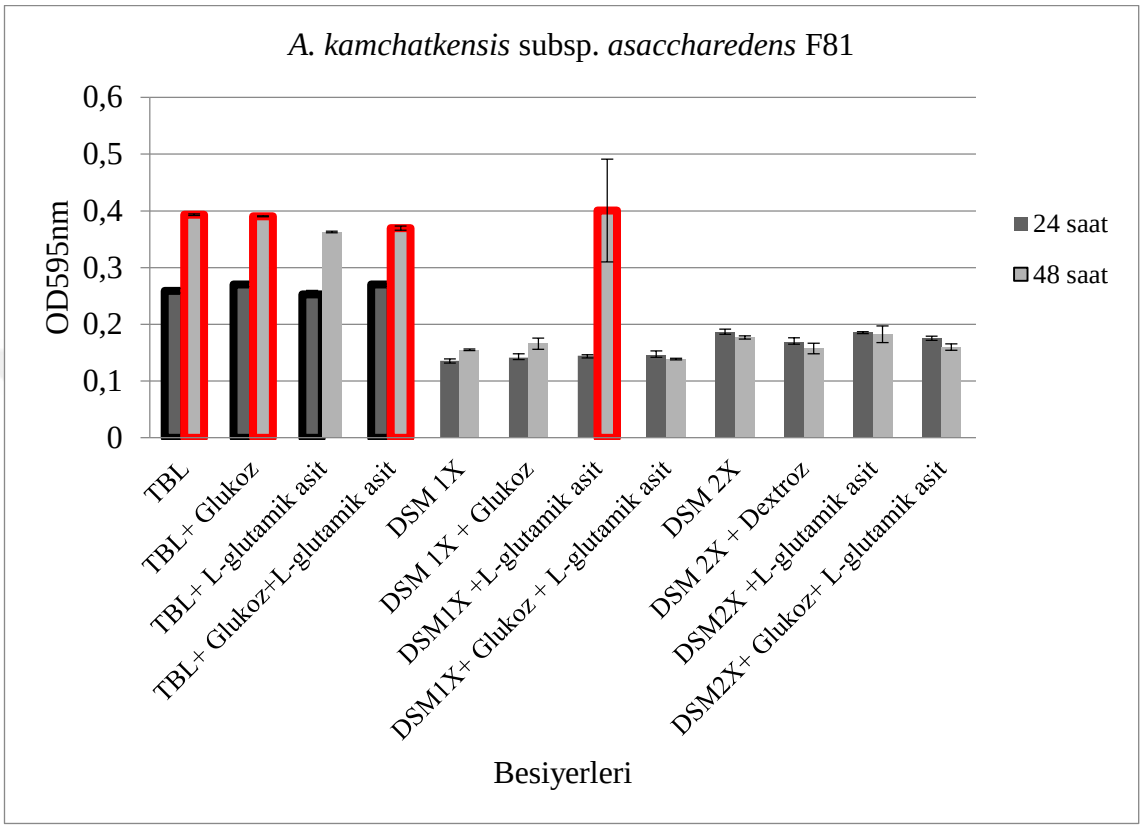
arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda B84a izolatının mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyerleri ise sırasıyla; TBL, TBL + Glukoz + L-glutamik asit, DSM1X, DSM2X ve DSM2X + L-glutamik asit olarak saptanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark, anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0).



Şekil 4.2 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi

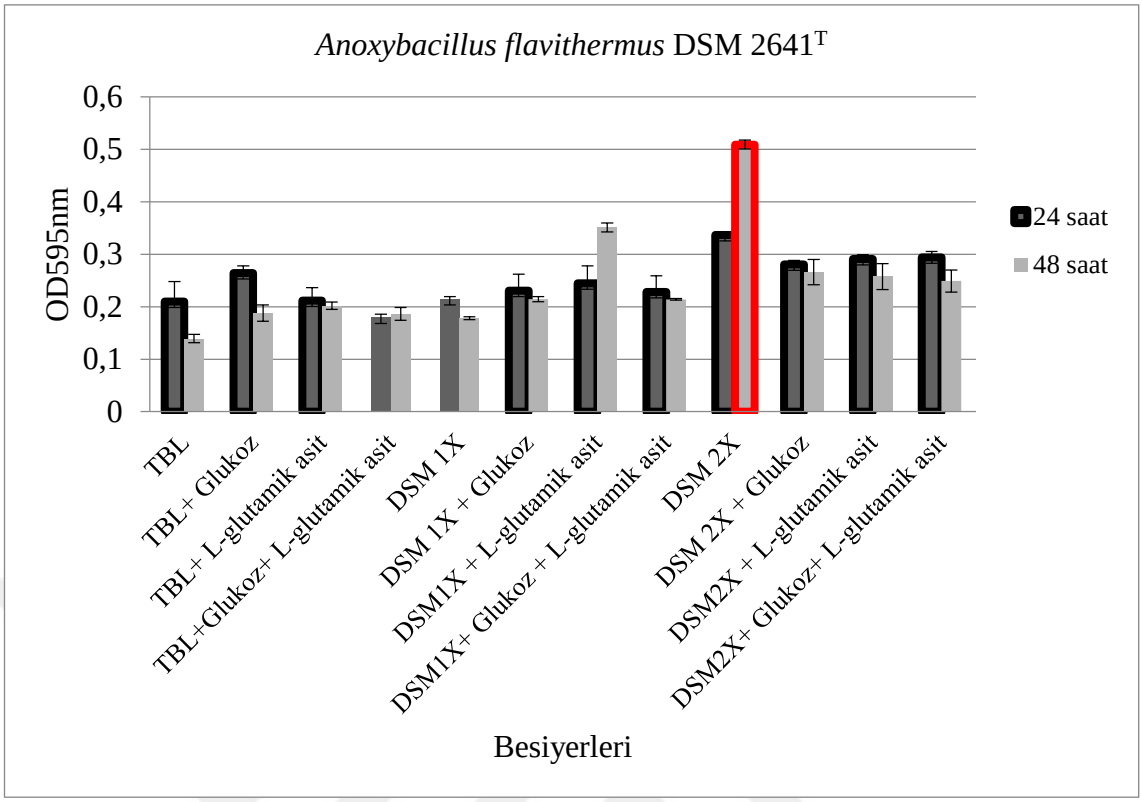
DSM 465^T suşunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyerleri sırasıyla; TBL, TBL + Glukoz, TBL + Glukoz + L-glutamik asit, DSM1X + Glukoz + L-glutamik asit, DSM2X ve DSM2X + Glukoz olarak saptanmıştır (Şekil 4.2). Ortalamalar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda DSM 465^T mikrobiyal

gelişime en çok katkı sağlayan besiyeri, DSM1X olarak saptanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0).



Şekil 4.3 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi

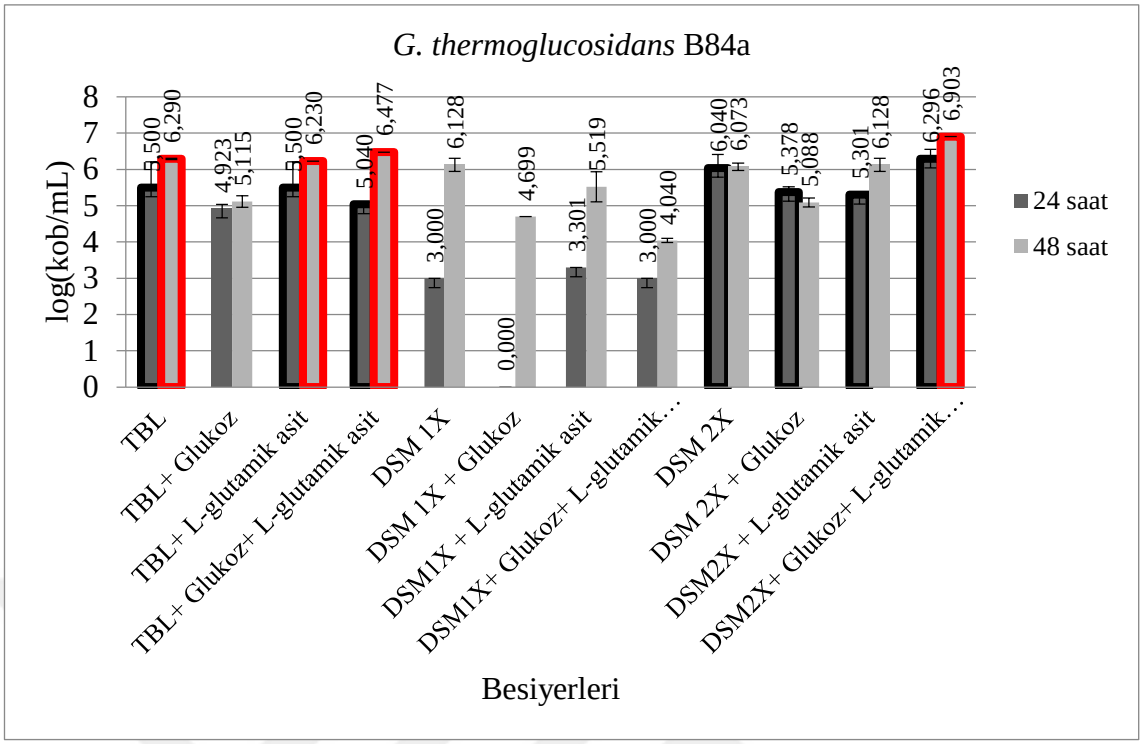
F81 izolatının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyerleri sırasıyla; TBL, TBL + Glukoz, TBL + L-glutamik asit ve TBL + Glukoz + L-glutamik asit olarak saptanmıştır (Şekil 4.3). Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon bitiminde F81 izolatının mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyerleri sırasıyla; TBL, TBL + Glukoz, TBL + Glukoz + L-glutamik asit ve DSM1X + L-glutamik asit olarak saptanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0).



Şekil 4.4 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerindeki 24-48 saatlik mikrobiyal gelişimi

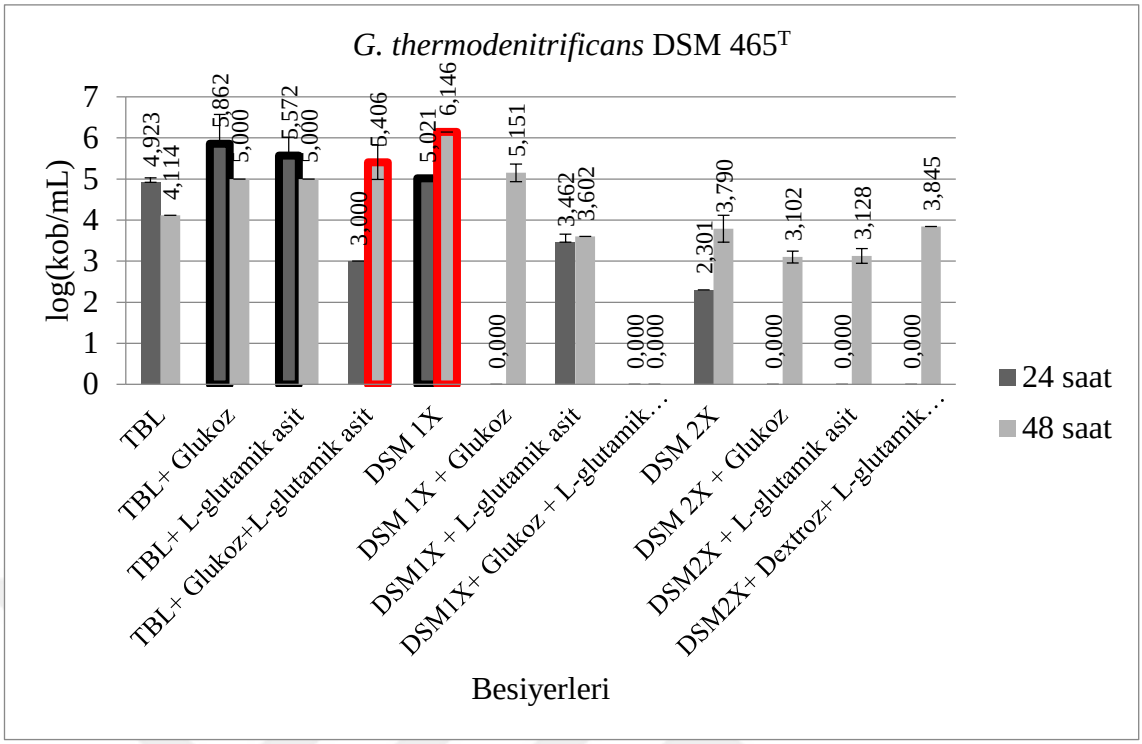
DSM 2641^T suşunun 24 saatlik inkübasyon süresi bitiminde mikrobiyal gelişimine TBL+ Glukoz + L-glutamik asit ve DSM1X besiyerleri haricinda geriye kalan tüm besiyerleri eşit düzeyde katkı sağlamıştır (Şekil 4.4). Genel ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0). DSM 2641^T 48 saatlik inkübasyon süresinin DSM 2641^T mikrobiyal gelişimine en çok katkı sağlayan besiyeri, DSM2X olarak saptanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi; Games-Howell karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0).

12 farklı sporulasyon besiyerinde mikrobiyal gelişimleri spektrofotmetrik olarak ölçülen 4 termofilik basilin, bu besiyerlerinde 24-48 saatlik süreler sonunda oluşturdukları spor miktarları şekil 4.5 ve şekil 4.8 arasındaki grafiklerde gösterilmiştir. Aynı zamanda sporulasyon süreçleri mikroskobik çalışmalarla da teyit edilmiştir.



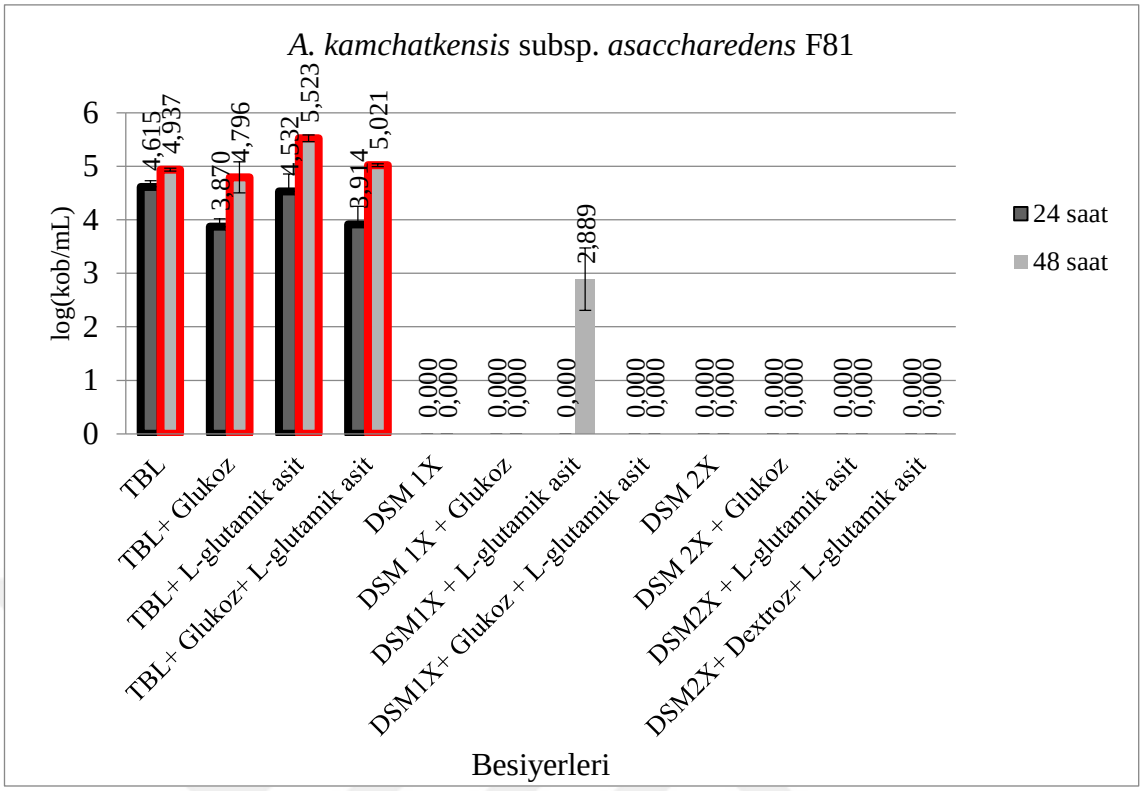
Şekil 4.5 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL))

Bu sonuçlara göre, B84a izolatı 24 saat sonunda en fazla TBL, TBL + L-glutamik asit, TBL + Glukoz + L-glutamik asit, DSM2X, DSM2X + Glukoz, DSM2X + L-glutamik asit, DSM2X + Glukoz + L-glutamik asit besiyerlerinde sporulasyona uğramıştır (Tek Yönlü Varyans Analizi, Tukey Testi, $p<0,05$), (SPSS 22.0). Bu izolat 48 saat sonunda ise en fazla TBL, TBL+L-Glutamik asit, TBL+ Glukoz + L-glutamik asit ve DSM2X+ Glukoz+ L-glutamik asit besiyerlerinde spor oluşturmuştur (Tek Yönlü Varyans Analizi, Tukey Testi, $p<0,05$), (SPSS 22.0).



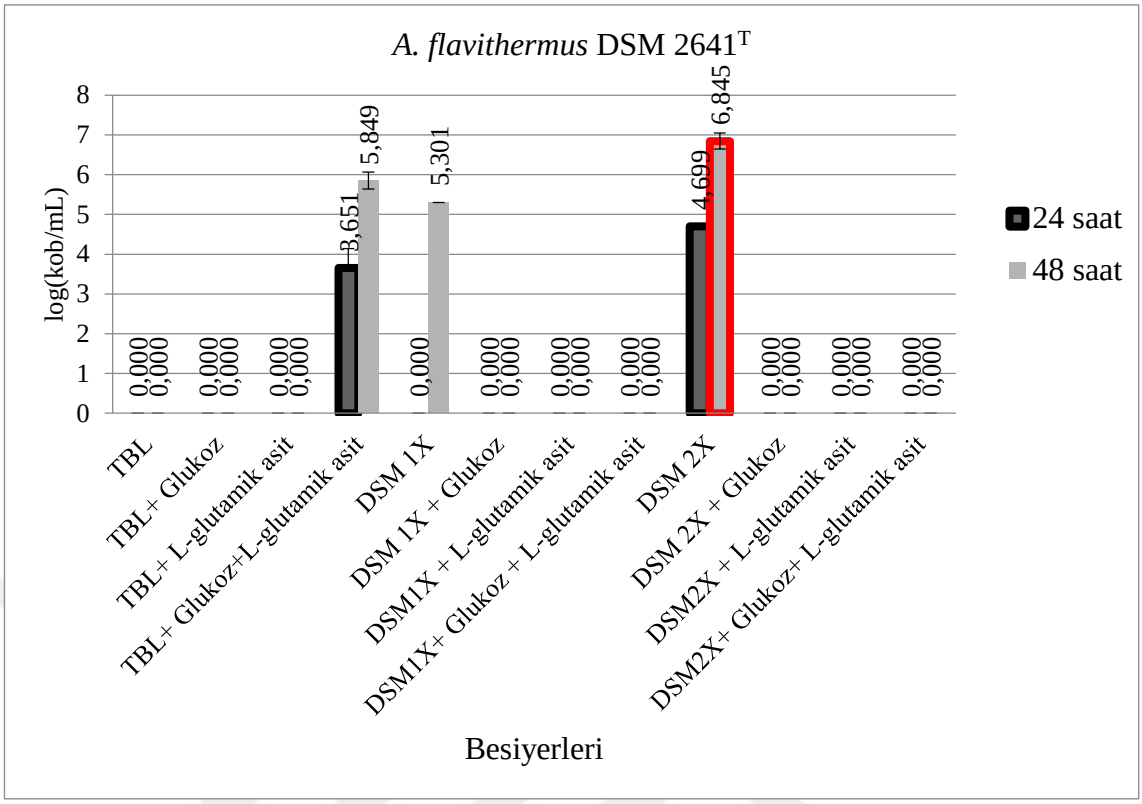
Şekil 4.6 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saatin sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL))

DSM 465^T suşunun 24- 48 saat sonunda oluşturduğu en yüksek sporulasyon miktarı TBL + Glukoz, TBL + L-glutamik asit ve DSM1X Besiyerleri ile saptanmıştır (Şekil 4.6) ve bu gruplar arasındaki sporulasyon düzeyi istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tek Yönlü Varyans Analizi, Tukey Testi, $p<0,05$), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon sonunda ise DSM 465^T için en yüksek sporulasyon TBL + Glukoz + L-glutamik asit ve DSM1X besiyerlerinde saptanmıştır (Tek yönlü varyans analizi, Tukey Testi, $p<0,05$), (SPSS 22.0).



Şekil 4.7 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının farklı sporulasyon besiyerlerin 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL))

F81 izolatının 24 saat sonunda, yalnızca TBL, TBL + Glukoz, TBL + L-glutamik asit ve TBL + Glukoz + L-glutamik asit besiyerlerinde sporulasyona uğradığı (Şekil 4.7) ve sporulasyon miktarının da en fazla TBL besiyerinde olduğu görülmektedir (Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch Testi, p=0,054, Games-Howell karşılaştırması p= 0,032), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon sonunda sporulasyon en yüksek düzeyde TBL, TBL + Glukoz, TBL + L-glutamik asit ve TBL + Glukoz + L-glutamik asit besiyerinlerinde görülmüştür ve bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır.



Şekil 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor miktarları (log(kob/mL))

24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda DSM 2641^T referansı için yalnızca iki besiyerinde sporulasyon saptanmıştır (TBL + Glukoz + L-glutamik asit ve DSM 2X), (Şekil 4.8). İki besiyeri arasındaki sporulasyon miktarları, istatistiki açıdan farklı bulunmamıştır. (Wilcoxon Testi, $p<0,05$), (SPSS 22.0). 48 saatlik inkübasyon bitiminde DSM 2641^T için en yüksek sporulasyon miktarı DSM2X besiyerinde saptanmıştır (Tek yönlü Varyans Analizi, Games Howell Karşılaştırması, $p<0,05$), (SPSS 22.0).

12 farklı besiyeri denenerek yürütülen bu çalışmalar sonucunda, her bir bakteriyi büyük hacimlerde geliştirmek amaçlı seçilen en uygun sporulasyon besiyerleri ve elde edilen spor oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Termofilik basillerin, 2 litrelik hacimlerdeki en ideal sporulasyon besiyerlerinde (Çizelge 4.1) 55 °C'de 48 saat boyunca 120 rpm'de çalkalanarak spor üretimleri sağlanmıştır. Ayrıca sporulasyon için 24 saatin yeterli gelmediği ve ideal spor oluşumu

için 48 saatlik bir süre gerektiği saptanmıştır. Büyük hacimde üretim için belirlenen besiyerleri ve inkübasyon koşulları uygulandığında, spor saflaştırması sonrası DSM 2641^T, F81 ve B84a için 10^9 spor/mL, DSM 465^T için ise 10^{10} spor/mL gibi çok yüksek konsantrasyonlarda spor stokları elde edilebilmiştir. Bu stoklar bundan sonraki çalışmalarda amaca uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek çalışmalara alınmıştır.

Çizelge 4.1 Tez kapsamında çalışılan suşlar için belirlenen yüksek hacimdeki sporulasyon besiyerlerinden elde edilen spor stok konsantrasyonları

Referans suş/İzolat	**Besiyeri/İnkübasyon Koşulları**	**Elde Edilen Spor Stok Konsantrasyonu**
A flavithermus DSM 2641^T	DSM 2X/55 °C, 120 rpm, 48 saat	10^9 spor/mL
A. kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	TBL+L-Glutamik asit/55 °C, 120 rpm, 48 saat	10^9 spor/mL
G. thermodenitrificans DSM 465^T	DSM 1X/55 °C, 120 rpm, 48 saat	10^{10} spor/mL
G. thermoglucosidans B84a	DSM 2X/55 °C, 120 rpm, 48 saat	10^9 spor/mL

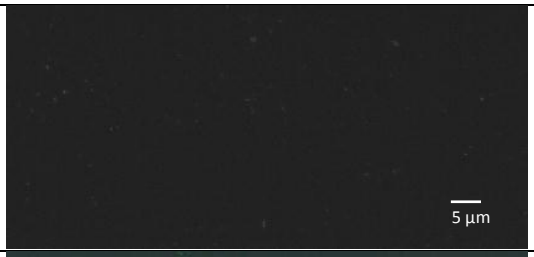
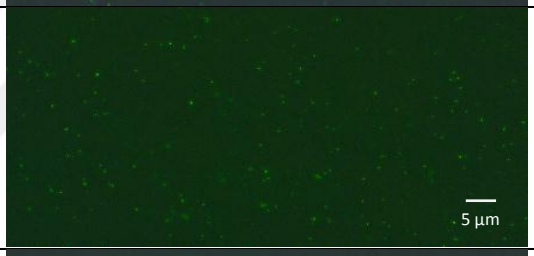
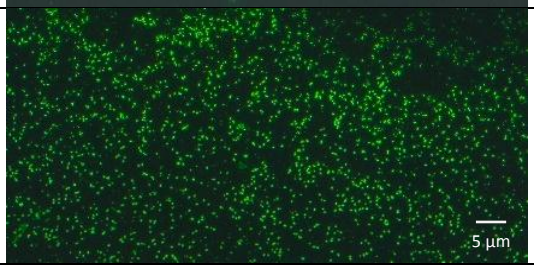
4.2 Saflaştırılan Sporların 6 Farklı Abiyotik Yüzeydeki Adezyon Özelliklerinin Etkilerinin Epifloresan Mikroskopu ile Belirlenmesi ve Karşılaştırılması

Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekliyle yapılan çalışmalar sonucunda, 4 termofilik türe ait saf sporların 316L tipi paslanmaz çelik (Çizelge 4.2), polipropilen (Çizelge 4.3), polivinilklorür (Çizelge 4.4), polikarbonat (Çizelge 4.5), teflon (Çizelge 4.6) ve kauçuk (Çizelge 4.7) yüzeylere tutunma afiniteleri hem epifloresan mikroskobunda hem de koloni sayım yöntemi ile (log kob/mL) belirlenmiştir.

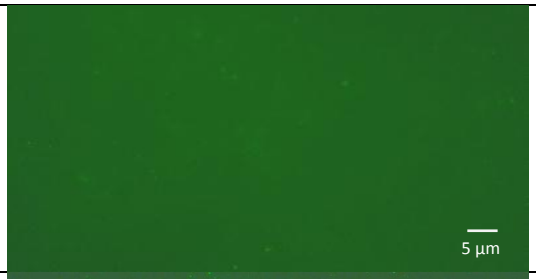
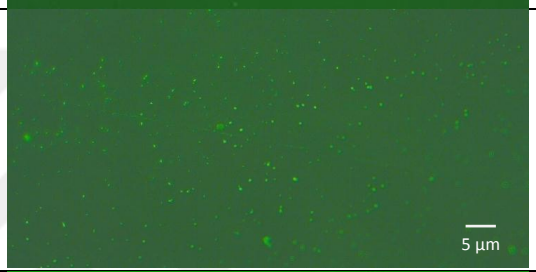
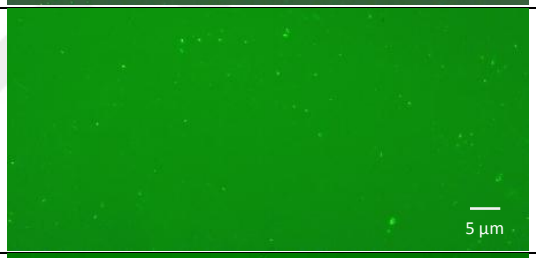
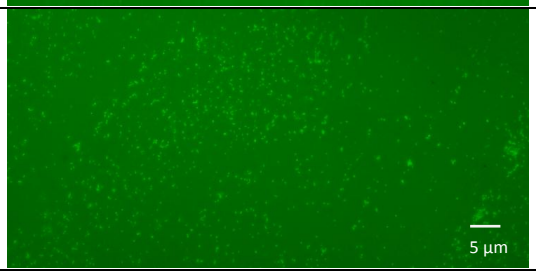
Aşağıda sunulan floresan mikroskobi resimlerinde de görüldüğü üzere, bu yüzeylerden özellikle polipropilen, polivinilklorür, polikarbonat (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5) gibi plastik tabiatlı her üç yüzeyde de akridin oranjın floresan spektrumunda, paslanmaz çelik, teflon ve kauçuk yüzeylerde gözlenmeyen aşırı bir parlama ve ışıma

oluşmuştur. Bu nedenle, özellikle polivinilklorür yüzeylerde görüntü alınırken Epifloresan mikroskobun Filter set20 Transmitter R Kırmızı renkteki filtresi (Excitation; ≈546 nm, Emission; ≈640 nm) ve diğer tüm yüzeyler için ise Filter set10 Transmitter G Yeşil renkteki filtresi (Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm) kullanılmıştır (Kepner ve Pratt 1994, Flint 1998). Epifloresan mikroskopunun kullanımı (4 bakteri X 6 yüzey olmak üzere 24 preparat) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Böylelikle farklı tür ve cinslerin sporlarının adezyon karakteristikleri belirlenmiştir. İlk defa, gıda çevrelerinde paslanmaz çelik dışında, kullanılan çeşitli abiyotik yüzeylerde (polikarbonat, polivinil klorür (PVC), polipropilen, kauçuk, teflon) *Geobacillus*/*Anoxybacillus* sporlarının adezyon karakteristikleri tespit edilmiştir.

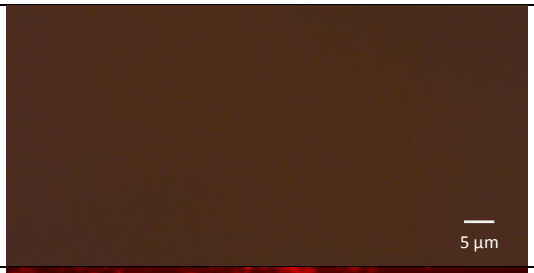
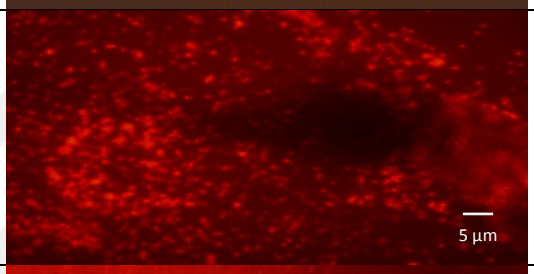
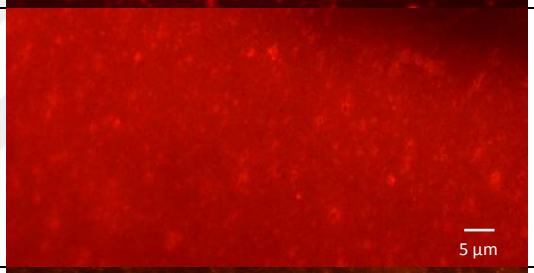
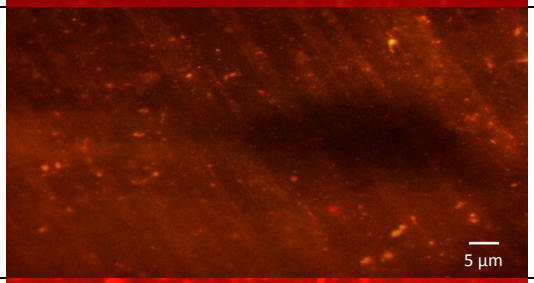
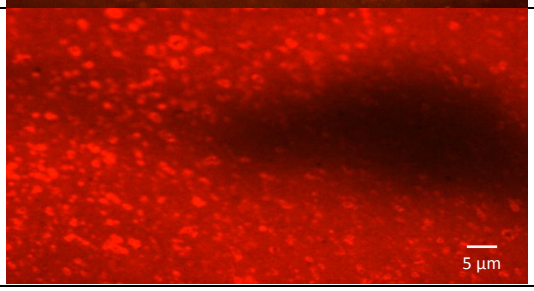
Çizelge 4.2 316 L tipi Paslanmaz çelik kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan Yeşil floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm)

Paslanmaz çelik	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	4,1	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	4,5	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. asaccharedens F81	3,7	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	5,8	

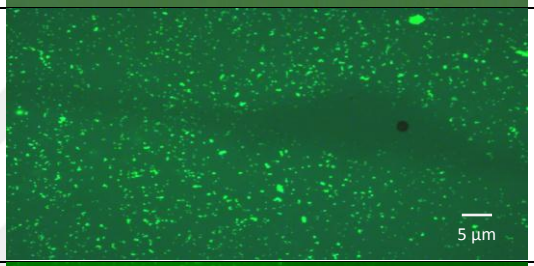
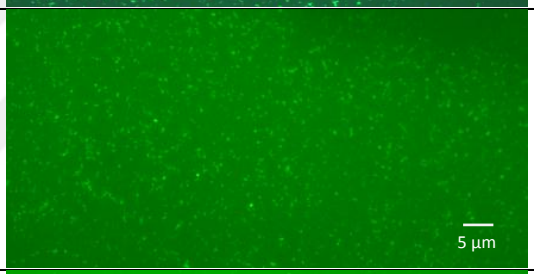
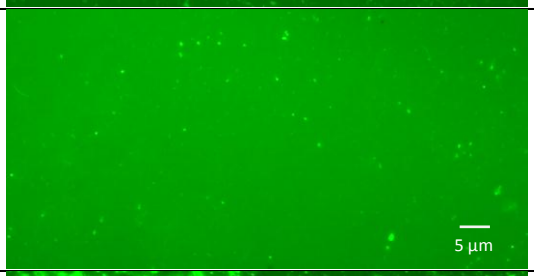
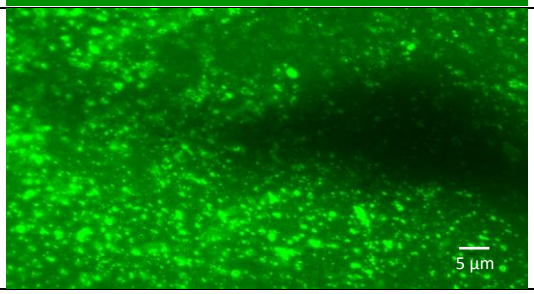
Çizelge 4.3 Polipropilen kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm)

Polipropilen	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	4,1	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	3,7	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	3,3	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	4,8	

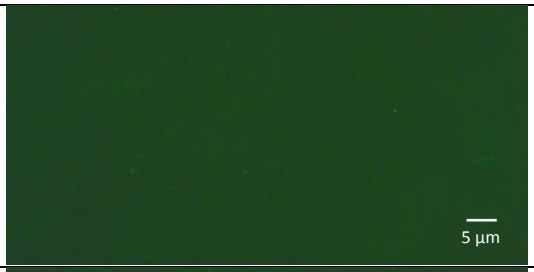
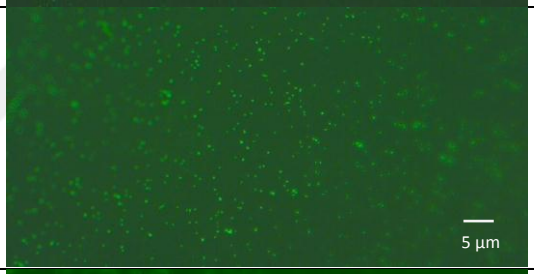
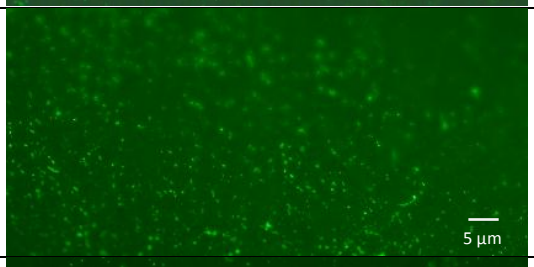
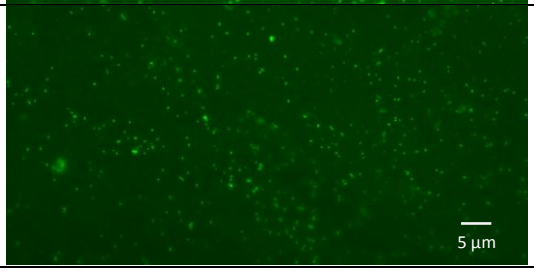
Çizelge 4.4 Polivinil klorür kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan Kırmızı floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈546 nm, Emission; ≈640 nm)

Polivinilklorür	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	4,3	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	4,3	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	3,9	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	5,6	

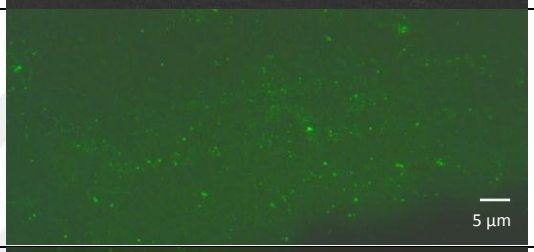
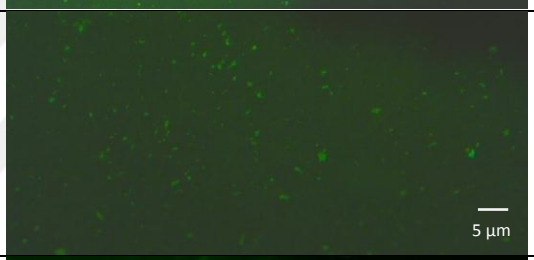
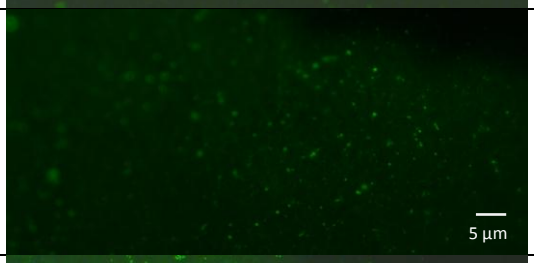
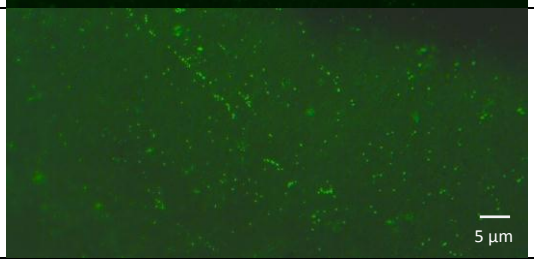
Çizelge 4.5 Polikarbonat kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm)

Polikarbonat	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	4,9	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	4,3	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	3,5	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	6,1	

Çizelge 4.6 Teflon kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm)

Teflon	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	4,0	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	5,1	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	4,1	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	5,7	

Çizelge 4.7 Kauçuk kupona (r=7 mm, kalınlık=1 mm) 30 dakikada tutanan sporların epifloresan mikroskopi görüntüleri ve spor sayım sonuçları (Kullanılan floresan ışığın dalga boyu: Excitation; ≈450-490 nm, Emission ≈515-565 nm)

Kauçuk	**Spor Sayıları (log kob/mL)**	**Epifloresan Mikroskopi Görüntüleri**
Steril Negatif Kontrol	-	
Geobacillus thermodenitrificans DSM 465^{T}	5,7	
Geobacillus thermoglucosidans B84a	4,1	
Anoxybacillus kamchatkensis subsp. *asaccharedens* F81	3,7	
Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^{T}	5,7	

Bu sonuçlara göre, serum fizyolojik ile süspanse edilmiş spor stoklarından 30 dakika içerisinde *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'in en çok kauçuk (5.7 log(kob/mL)) ve polikarbonat (4.9 log(kob/ml)), *G. thermoglucosidans* B84a'nın teflon (5,1 log(kob/ml)) ve paslanmaz çelik (4,5 log(kob/mL)), *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81'in teflon (4,1 log(kob/ml)) ve polivinilklorür (3,9 log(kob/ml)), *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'nin ise en çok polikarbonat (6,1 log(kob/ml)) ve paslanmaz çelik (5,8 log(kob/ml)) yüzeyleri tercih etikleri ve daha sıkı bir temasla belirtilen bu yüzeylere tutunarak yapıştıkları, gerek spor sayımı gerekse Epifloresan mikroskopi analizi ile gözlemlenmiştir. Epifloresan mikrosopisinde görüntülenen yaklaşık 1-2 µm'lik çaplara sahip sporlar, kullanılan ışığın dalga boyuna bağlı olarak yüzeylerde yeşil ya da kırmızı renkte tekli veya kümeler meydana getirerek parlak bir floresan görüntü oluşturmuşlardır. Mikroskopi görüntüleri ile spor sayım sonuçları da yine paralellik göstermiş olup, yoğun spor sayımı yapılan preparatlardaki floresan ışıma da daha yoğun gözlenmiştir.

4.3 Sporisidal Ajanların Termofilik Basillerin Sporları Üzerindeki Etkinliklerinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2.4'de ki çizelge 3.54'e uygun olarak, gerekli görülen durumlarda 3 farklı konsantrasyon skalasında ve farklı temas sürelerinde (8 süre) test edilen 12 sporisidal ajanın, 4 sporlu basil üzerindeki etkinliklerinin sonuçları çizelge 4.- 4.11 arasında gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, klorin dioksit, fenol ve iyodin sadece *G. thermoglucosidans* B84a'nın, sodyum hipoklorit (NaOCl) *G. thermoglucosidans* B84a ve *G. thermodenitrificans* DSM 465'in, krezol *G. thermoglucosidans* B84a ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81'in, klorokrezol ve gluteraldehit *G. thermoglucosidans* B84a ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81'in sporları üzerinde etkili bulunmuştur.

Bunun yanısıra, nitrik asit (HNO_3) *A. flavithermus* DSM 2641^{T}, *G. thermoglucosidans* B84a ile *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 sporlarının % 100'ünü ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'ın sporlarının % 99,998'ini, klorhekzidin diasetat *A. flavithermus* DSM 2641^{T}, *G. thermoglucosidans* B84a ile *A. kamchatkensis* subsp.

asaccharedens F81'in sporlarının %100'ünü ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'ın sporlarının ise % 99,993'ünün çizelge 4.9- 4.12 arasında belirtilen konsantrasyonlar ve temas süreleri dahilinde elimine edilmesine imkan sağlamışlardır. Tüm termofil sporlarının tamamen giderilmesi ise sadece perasetik asit, setilpridinyum klorit ve formaldehit ile başarılabilmiştir.

Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları

Sporosidal Ajan		***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**							
Konsantrasyon	**Klorin dioksit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(200 ppm)	kob	100000	100000	100000	8750	7560	7000	6500	3980
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	3,942	3,879	3,845	3,813	3,600
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	1,058	1,121	1,155	1,187	1,400
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**91,250**	**92,440**	**93,000**	**93,500**	**96,020**
(400 ppm)	Kob	100000	100000	8400	7200	6350	5000	4200	3840
	log(kob)	5,000	5,000	3,924	3,857	3,803	3,699	3,623	3,584
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	1,076	1,143	1,197	1,301	1,377	1,416
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**91,600**	**92,800**	**93,650**	**95,000**	**95,800**	**96,160**
(600 ppm)	Kob	6200	5410	2330	184	28	14	5	3
	log(kob)	3,792	3,733	3,367	2,265	1,447	1,146	0,699	0,477
	Logaritmik azalma	1,208	1,267	1,633	2,735	3,553	3,854	4,301	4,523
	Logaritmik yüzde azalma	**93,800**	**94,590**	**97,670**	**99,816**	**99,972**	**99,986**	**99,995**	**99,997**
Konsantrasyon	**Fenol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	4000	4500	8400	8960	9200	9520	9800	9880
	log(kob)	3,602	3,653	3,924	3,952	3,964	3,979	3,991	3,995
	Logaritmik azalma	1,398	1,347	1,076	1,048	1,036	1,021	1,009	1,005
	Logaritmik yüzde azalma	**96,000**	**95,500**	**91,600**	**91,040**	**90,800**	**90,480**	**90,200**	**90,120**
(% 1,0)	Kob	5120	6200	7800	8840	9000	9410	9500	9540
	log(kob)	3,709	3,792	3,892	3,946	3,954	3,974	3,978	3,980
	Logaritmik azalma	1,291	1,208	1,108	1,054	1,046	1,026	1,022	1,020
	Logaritmik yüzde azalma	**94,880**	**93,800**	**92,200**	**91,160**	**91,000**	**90,590**	**90,500**	**90,460**
(% 1,5)	Kob	4800	5400	6000	6420	7000	8700	8880	9300
	log(kob)	3,68	3,73	3,78	3,81	3,85	3,94	3,95	3,97
	Logaritmik azalma	1,32	1,27	1,22	1,19	1,15	1,06	1,05	1,03
	Logaritmik yüzde azalma	**95,200**	**94,600**	**94,000**	**93,580**	**93,000**	**91,300**	**91,120**	**90,700**

75

Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki sodyum hipokilorit ve m-krezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**							
Konsantrasyon	**NaOCl**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(20 ppm)	kob	100000	8800	7500	5000	4150	3200	1210	270
	log(kob)	5,000	3,944	3,875	3,699	3,618	3,505	3,083	2,431
	Logaritmik azalma	0,000	1,056	1,125	1,301	1,382	1,495	1,917	2,569
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**91,200**	**92,500**	**95,000**	**95,850**	**96,800**	**98,790**	**99,730**
(40 ppm)	Kob	100000	8420	5800	4220	1850	1200	850	180
	log(kob)	5,000	3,925	3,763	3,625	3,267	3,079	2,929	2,255
	Logaritmik azalma	0,000	1,075	1,237	1,375	1,733	1,921	2,071	2,745
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**91,580**	**94,200**	**95,780**	**98,150**	**98,800**	**99,150**	**99,820**
(60 ppm)	Kob	7000	6840	5100	2700	1550	950	290	95
	log(kob)	3,845	3,835	3,708	3,431	3,190	2,978	2,462	1,978
	Logaritmik azalma	1,155	1,165	1,292	1,569	1,810	2,022	2,538	3,022
	Logaritmik yüzde azalma	**93,000**	**93,160**	**94,900**	**97,300**	**98,450**	**99,050**	**99,710**	**99,905**
Konsantrasyon	**krezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	100000	100000	9500	9200	8700	8300	8200	7950
	log(kob)	5,000	5,000	3,978	3,964	3,940	3,919	3,914	3,900
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	1,022	1,036	1,060	1,081	1,086	1,100
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**90,500**	**90,800**	**91,300**	**91,700**	**91,800**	**92,050**
(% 1,0)	kob	100000	9880	9400	9000	8100	8000	7960	7500
	log(kob)	5,000	3,995	3,973	3,954	3,908	3,903	3,901	3,875
	Logaritmik azalma	0,000	1,005	1,027	1,046	1,092	1,097	1,099	1,125
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**90,120**	**90,600**	**91,000**	**91,900**	**92,000**	**92,040**	**92,500**
(% 1,5)	kob	100000	9700	9200	8880	8000	7900	7540	7000
	log(kob)	5,000	3,987	3,964	3,948	3,903	3,898	3,877	3,845
	Logaritmik azalma	0,000	1,013	1,036	1,052	1,097	1,102	1,123	1,155
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**90,300**	**90,800**	**91,120**	**92,000**	**92,100**	**92,460**	**93,000**

Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^T için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki nitrik asit ve klorokrezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. flavithermus* DSM 2641^T**							
Konsantrasyon	**HNO_3**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 1,0)	kob	730	600	540	460	450	442	425	280
	log(kob)	2,863	2,778	2,732	2,663	2,653	2,645	2,628	2,447
	Logaritmik azalma	2,137	2,222	2,268	2,337	2,347	2,355	2,372	2,553
	Logaritmik yüzde azalma	**99,270**	**99,400**	**99,460**	**99,540**	**99,550**	**99,558**	**99,575**	**99,720**
(% 2,0)	kob	632	560	450	170	106	12	0	0
	log(kob)	2,801	2,748	2,653	2,230	2,025	1,079	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,199	2,252	2,347	2,770	2,975	3,921	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,368**	**99,440**	**99,550**	**99,830**	**99,894**	**99,988**	**100,000**	**100,000**
(% 3,0)	kob	550	400	120	4	1	1	0	0
	log(kob)	2,740	2,602	2,079	0,602	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,260	2,398	2,921	4,398	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,450**	**99,600**	**99,880**	**99,996**	**99,999**	**99,999**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorokrezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,4)	kob	100000	100000	100000	100000	8800	8430	6500	5320
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	3,944	3,926	3,813	3,726
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	1,056	1,074	1,187	1,274
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**91,200**	**91,570**	**93,500**	**94,680**
(% 0,8)	kob	8420	7850	8000	8200	7400	6950	6500	6370
	log(kob)	3,925	3,895	3,903	3,914	3,869	3,842	3,813	3,804
	Logaritmik azalma	1,075	1,105	1,097	1,086	1,131	1,158	1,187	1,196
	Logaritmik yüzde azalma	**91,580**	**92,150**	**92,000**	**91,800**	**92,600**	**93,050**	**93,500**	**93,630**
(% 1,2)	kob	8100	7950	7900	7510	7250	6800	6420	6000
	log(kob)	3,908	3,900	3,898	3,876	3,860	3,833	3,808	3,778
	Logaritmik azalma	1,092	1,100	1,102	1,124	1,140	1,167	1,192	1,222
	Logaritmik yüzde azalma	**91,900**	**92,050**	**92,100**	**92,490**	**92,750**	**93,200**	**93,580**	**94,000**

Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki iyodinin ve tek konsantrasyondaki perasetik asit ve gluteraldehitin spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**							
Konsantrasyon	**İyodin**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(12,5 ppm)	kob	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
(25 ppm)	kob	100000	100000	100000	100000	100000	100000	9800	9400
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	3,991	3,973
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,009	1,027
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**90,200**	**90,600**
(37,5 ppm)	kob	100000	100000	100000	100000	9640	9500	9230	8800
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	3,984	3,978	3,965	3,944
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	1,016	1,022	1,035	1,056
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**90,360**	**90,500**	**90,770**	**91,200**
Konsantrasyon	**Perasetik asit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 4,0)	kob	12	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,079	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,921	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,988**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Gluteraldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 2,0)	kob	4120	640	280	5	1	8	25	3
	log(kob)	3,615	2,806	2,447	0,699	0,000	0,903	1,398	0,477
	Logaritmik azalma	1,385	2,194	2,553	4,301	5,000	4,097	3,602	4,523
	Logaritmik yüzde azalma	**95,880**	**99,360**	**99,720**	**99,995**	**99,999**	**99,992**	**99,975**	**99,997**

Çizelge 4.8 *A. flavithermus* DSM 2641^{T} için uygulanan formaldehitin, klorhekzidin diasetatın ve setilpiridinyum klorürün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**							
Konsantrasyon	**Formaldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,8)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorhekzidin diasetat**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	240	180	11	10	9	5	3	0
	log(kob)	2,380	2,255	1,041	1,000	0,954	0,699	0,477	0,000
	Logaritmik azalma	2,620	2,745	3,959	4,000	4,046	4,301	4,523	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,760**	**99,820**	**99,989**	**99,990**	**99,991**	**99,995**	**99,997**	**100,000**
Konsantrasyon	**Setilpiridinyum klorür**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	190	85	42	5	2	2	0	0
	log(kob)	2,279	1,929	1,623	0,699	0,301	0,301	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,721	3,071	3,377	4,301	4,699	4,699	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,810**	**99,915**	**99,958**	**99,995**	**99,998**	**99,998**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları

Sporosidal Ajan		***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**							
Konsantrasyon	**Klorin dioksit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(200 ppm)	kob	1260	1200	1072	980	712	513	322	304
	log(kob)	3,100	3,079	3,030	2,991	2,852	2,710	2,508	2,483
	Logaritmik azalma	1,900	1,921	1,970	2,009	2,148	2,290	2,492	2,517
	Logaritmik yüzde azalma	**98,740**	**98,800**	**98,928**	**99,020**	**99,288**	**99,487**	**99,678**	**99,696**
(400 ppm)	kob	1200	1150	664	536	533	448	400	144
	log(kob)	3,079	3,061	2,822	2,729	2,727	2,651	2,602	2,158
	Logaritmik azalma	1,921	1,939	2,178	2,271	2,273	2,349	2,398	2,842
	Logaritmik yüzde azalma	**98,800**	**98,850**	**99,336**	**99,464**	**99,467**	**99,552**	**99,600**	**99,856**
(600 ppm)	kob	1152	912	688	670	610	420	350	5
	log(kob)	3,061	2,960	2,838	2,826	2,785	2,623	2,544	0,699
	Logaritmik azalma	1,939	2,040	2,162	2,174	2,215	2,377	2,456	4,301
	Logaritmik yüzde azalma	**98,848**	**99,088**	**99,312**	**99,330**	**99,390**	**99,580**	**99,650**	**99,995**
Konsantrasyon	**Fenol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	30	56	280	380	385	456	520	788
	log(kob)	1,477	1,748	2,447	2,580	2,585	2,659	2,716	2,897
	Logaritmik azalma	3,523	3,252	2,553	2,420	2,415	2,341	2,284	2,103
	Logaritmik yüzde azalma	**99,970**	**99,944**	**99,720**	**99,620**	**99,615**	**99,544**	**99,480**	**99,212**
(% 1,0)	kob	6	19	94	132	146	398	640	650
	log(kob)	0,778	1,279	1,973	2,121	2,164	2,600	2,806	2,813
	Logaritmik azalma	4,222	3,721	3,027	2,879	2,836	2,400	2,194	2,187
	Logaritmik yüzde azalma	**99,994**	**99,981**	**99,906**	**99,868**	**99,854**	**99,602**	**99,360**	**99,350**
(% 1,5)	kob	5	11	20	32	98	228	396	425
	log(kob)	0,699	1,041	1,301	1,505	1,991	2,358	2,598	2,628
	Logaritmik azalma	4,301	3,959	3,699	3,495	3,009	2,642	2,402	2,372
	Logaritmik yüzde azalma	**99,995**	**99,989**	**99,980**	**99,968**	**99,902**	**99,772**	**99,604**	**99,575**

Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki sodyum hipoklorit ve m-krezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**							
Konsantrasyon	**NaOCl**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(20 ppm)	kob	1016	888	756	700	670	650	632	296
	log(kob)	3,007	2,948	2,879	2,845	2,826	2,813	2,801	2,471
	Logaritmik azalma	1,993	2,052	2,121	2,155	2,174	2,187	2,199	2,529
	Logaritmik yüzde azalma	**98,984**	**99,112**	**99,244**	**99,300**	**99,330**	**99,350**	**99,368**	**99,704**
(40 ppm)	kob	624	560	480	430	272	192	189	162
	log(kob)	2,795	2,748	2,681	2,633	2,435	2,283	2,276	2,210
	Logaritmik azalma	2,205	2,252	2,319	2,367	2,565	2,717	2,724	2,790
	Logaritmik yüzde azalma	**99,376**	**99,440**	**99,520**	**99,570**	**99,728**	**99,808**	**99,811**	**99,838**
(60 ppm)	kob	574	498	350	272	150	144	124	54
	log(kob)	2,759	2,697	2,544	2,435	2,176	2,158	2,093	1,732
	Logaritmik azalma	2,241	2,303	2,456	2,565	2,824	2,842	2,907	3,268
	Logaritmik yüzde azalma	**99,426**	**99,502**	**99,650**	**99,728**	**99,850**	**99,856**	**99,876**	**99,946**
Konsantrasyon	**krezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	34	34	190	268	368	423	536	544
	log(kob)	1,531	1,531	2,279	2,428	2,566	2,626	2,729	2,736
	Logaritmik azalma	3,469	3,469	2,721	2,572	2,434	2,374	2,271	2,264
	Logaritmik yüzde azalma	**99,966**	**99,966**	**99,810**	**99,732**	**99,632**	**99,577**	**99,464**	**99,456**
(% 1,0)	kob	14	65	110	136	188	202	268	336
	log(kob)	1,146	1,813	2,041	2,134	2,274	2,305	2,428	2,526
	Logaritmik azalma	3,854	3,187	2,959	2,866	2,726	2,695	2,572	2,474
	Logaritmik yüzde azalma	**99,986**	**99,935**	**99,890**	**99,864**	**99,812**	**99,798**	**99,732**	**99,664**
(% 1,5)	kob	0	1	2	2	3	72	88	102
	log(kob)	0,000	0,000	0,301	0,301	0,477	1,857	1,944	2,009
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	4,699	4,699	4,523	3,143	3,056	2,991
	Logaritmik yüzde azalma	**100,00**	**99,999**	**99,998**	**99,998**	**99,997**	**99,928**	**99,912**	**99,898**

Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki nitrik asitin ve klorokrezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**							
Konsantrasyonu	**HNO_3**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 1,0)	kob	720	518	194	187	186	156	120	54
	log(kob)	2,857	2,714	2,288	2,272	2,270	2,193	2,079	1,732
	Logaritmik azalma	2,143	2,286	2,712	2,728	2,730	2,807	2,921	3,268
	Logaritmik yüzde azalma	**99,280**	**99,482**	**99,806**	**99,813**	**99,814**	**99,844**	**99,880**	**99,946**
(% 2,0)	kob	92	74	50	2	1	0	0	0
	log(kob)	1,964	1,869	1,699	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,036	3,131	3,301	4,699	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,908**	**99,926**	**99,950**	**99,998**	**99,999**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 3,0)	kob	64	36	14	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,806	1,556	1,146	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,194	3,444	3,854	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,936**	**99,964**	**99,986**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyonu	**Klorokrezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,4)	kob	320	200	184	58	48	40	32	10
	log(kob)	2,505	2,301	2,265	1,763	1,681	1,602	1,505	1,000
	Logaritmik azalma	2,495	2,699	2,735	3,237	3,319	3,398	3,495	4,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,680**	**99,800**	**99,816**	**99,942**	**99,952**	**99,960**	**99,968**	**99,990**
(% 0,8)	kob	12	4	3	2	2	0	0	0
	log(kob)	1,079	0,602	0,477	0,301	0,301	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,921	4,398	4,523	4,699	4,699	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,988**	**99,996**	**99,997**	**99,998**	**99,998**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,2)	kob	2	1	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,699	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,998**	**99,999**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki iyodinin ve tek konsantrasyondaki perasetik asitin ve gluteraldehitin spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**							
Konsantrasyon	**İyodin**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(12,5 ppm)	kob	3240	2878	2800	2764	2466	2450	2200	1850
	log(kob)	3,511	3,459	3,447	3,442	3,392	3,389	3,342	3,267
	Logaritmik azalma	1,489	1,541	1,553	1,558	1,608	1,611	1,658	1,733
	Logaritmik yüzde azalma	**96,760**	**97,122**	**97,200**	**97,236**	**97,534**	**97,550**	**97,800**	**98,150**
(25 ppm)	kob	2780	2430	2350	1876	1700	1688	1500	1422
	log(kob)	3,444	3,386	3,371	3,273	3,230	3,227	3,176	3,153
	Logaritmik azalma	1,556	1,614	1,629	1,727	1,770	1,773	1,824	1,847
	Logaritmik yüzde azalma	**97,220**	**97,570**	**97,650**	**98,124**	**98,300**	**98,312**	**98,500**	**98,578**
(37,5 ppm)	kob	2400	1984	1762	1546	1390	1368	1200	1106
	log(kob)	0,504	3,298	3,246	3,189	3,143	3,136	3,079	3,044
	Logaritmik azalma	4,496	1,702	1,754	1,811	1,857	1,864	1,921	1,956
	Logaritmik yüzde azalma	**99,997**	**98,016**	**98,238**	**98,454**	**98,610**	**98,632**	**98,800**	**98,894**
Konsantrasyon	**Perasetik asit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Gluteraldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 2,0)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.9 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 için uygulanan tek konsantrasyondaki formaldehitin, klorhekzidin diasetatın ve setilpiridinyum klorürün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**							
Konsantrasyon	**Formaldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,8)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorhekzidin diasetat**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	116	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	2,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,936	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,884**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Setilpiridinyum klorür**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	61	24	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,785	1,380	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,215	3,620	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,939**	**99,976**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4. 10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorindioksitin ve fenolün spor eliminasyon sonuçları

Sporosidal Ajan		***G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}**							
Konsantrasyon	**Klorin dioksit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(200 ppm)	kob	7640	7500	6700	5660	5600	3870	2500	2340
	log(kob)	3,883	3,875	3,826	3,753	3,748	3,588	3,398	3,369
	Logaritmik azalma	1,117	1,125	1,174	1,247	1,252	1,412	1,602	1,631
	Logaritmik yüzde azalma	**92,360**	**92,500**	**93,300**	**94,340**	**94,400**	**96,130**	**97,500**	**97,660**
(400 ppm)	kob	6980	6800	5420	4800	4770	2960	2200	1980
	log(kob)	3,844	3,833	3,734	3,681	3,679	3,471	3,342	3,297
	Logaritmik azalma	1,156	1,167	1,266	1,319	1,321	1,529	1,658	1,703
	Logaritmik yüzde azalma	**93,020**	**93,200**	**94,580**	**95,200**	**95,230**	**97,040**	**97,800**	**98,020**
(600 ppm)	kob	6100	5840	5230	4000	3950	2300	1950	1800
	log(kob)	3,785	3,766	3,719	3,602	3,597	3,362	3,290	3,255
	Logaritmik azalma	1,215	1,234	1,281	1,398	1,403	1,638	1,710	1,745
	Logaritmik yüzde azalma	**93,900**	**94,160**	**94,770**	**96,000**	**96,050**	**97,700**	**98,050**	**98,200**
Konsantrasyon	**Fenol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	7990	6210	6200	5920	5700	5100	4340	3700
	log(kob)	3,903	3,793	3,792	3,772	3,756	3,708	3,637	3,568
	Logaritmik azalma	1,097	1,207	1,208	1,228	1,244	1,292	1,363	1,432
	Logaritmik yüzde azalma	**92,010**	**93,790**	**93,800**	**94,080**	**94,300**	**94,900**	**95,660**	**96,300**
(% 1,0)	kob	6440	6220	5980	5760	5600	4800	3880	3520
	log(kob)	3,809	3,794	3,777	3,760	3,748	3,681	3,589	3,547
	Logaritmik azalma	1,191	1,206	1,223	1,240	1,252	1,319	1,411	1,453
	Logaritmik yüzde azalma	**93,560**	**93,780**	**94,020**	**94,240**	**94,400**	**95,200**	**96,120**	**96,480**
(% 1,5)	kob	5640	5680	5320	4800	4540	4040	3550	3000
	log(kob)	3,751	3,754	3,726	3,681	3,657	3,606	3,550	3,477
	Logaritmik azalma	1,249	1,246	1,274	1,319	1,343	1,394	1,450	1,523
	Logaritmik yüzde azalma	**94,360**	**94,320**	**94,680**	**95,200**	**95,460**	**95,960**	**96,450**	**97,000**

Çizelge 4.10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki sodyum hipokloritin ve m-krezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}**							
Konsantrasyon	**NaOCl**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(20 ppm)	kob	1250	950	880	560	420	350	280	180
	log(kob)	3,097	2,978	2,944	2,748	2,623	2,544	2,447	2,255
	Logaritmik azalma	1,903	2,022	2,056	2,252	2,377	2,456	2,553	2,745
	Logaritmik yüzde azalma	**98,750**	**99,050**	**99,120**	**99,440**	**99,580**	**99,650**	**99,720**	**99,820**
(40 ppm)	kob	1100	940	800	400	250	84	0	0
	log(kob)	3,041	2,973	2,903	2,602	2,398	1,924	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	1,959	2,027	2,097	2,398	2,602	3,076	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**98,900**	**99,060**	**99,200**	**99,600**	**99,750**	**99,916**	**100,000**	**100,000**
(60 ppm)	kob	280	264	260	30	0	0	0	0
	log(kob)	2,447	2,422	2,415	1,477	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,553	2,578	2,585	3,523	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,720**	**99,736**	**99,740**	**99,970**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**krezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**
(% 1,0)	kob	100000	100000	100000	100000	100000	8000	7800	5400
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	3,903	3,892	3,732
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,097	1,108	1,268
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**92,000**	**92,200**	**94,600**
(% 1,5)	kob	100000	100000	100000	100000	7500	6800	5000	4200
	log(kob)	5,000	5,000	5,000	5,000	3,875	3,833	3,699	3,623
	Logaritmik azalma	0,000	0,000	0,000	0,000	1,125	1,167	1,301	1,377
	Logaritmik yüzde azalma	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**92,500**	**93,200**	**95,000**	**95,800**

Çizelge 4.10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki nitrik asitin ve klorokrezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermodenitrificans* DSM 465^T**							
Konsantrasyon	**HNO_3**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 1,0)	kob	1250	972	841	650	430	395	265	252
	log(kob)	3,097	2,988	2,925	2,813	2,633	2,597	2,423	2,401
	Logaritmik azalma	1,903	2,012	2,075	2,187	2,367	2,403	2,577	2,599
	Logaritmik yüzde azalma	**98,750**	**99,028**	**99,159**	**99,350**	**99,570**	**99,605**	**99,735**	**99,748**
(% 2,0)	kob	754	594	566	320	152	122	148	8
	log(kob)	2,877	2,774	2,753	2,505	2,182	2,086	2,170	0,903
	Logaritmik azalma	2,123	2,226	2,247	2,495	2,818	2,914	2,830	4,097
	Logaritmik yüzde azalma	**99,246**	**99,406**	**99,434**	**99,680**	**99,848**	**99,878**	**99,852**	**99,992**
(% 3,0)	kob	341	250	142	82	68	56	19	2
	log(kob)	2,533	2,398	2,152	1,914	1,833	1,748	1,279	0,301
	Logaritmik azalma	2,467	2,602	2,848	3,086	3,167	3,252	3,721	4,699
	Logaritmik yüzde azalma	**99,659**	**99,750**	**99,858**	**99,918**	**99,932**	**99,944**	**99,981**	**99,998**
Konsantrasyon	**Klorokrezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,4)	kob	770	742	552	478	370	363	328	321
	log(kob)	2,886	2,870	2,742	2,679	2,568	2,560	2,516	2,507
	Logaritmik azalma	2,114	2,130	2,258	2,321	2,432	2,440	2,484	2,493
	Logaritmik yüzde azalma	**99,230**	**99,258**	**99,448**	**99,522**	**99,630**	**99,637**	**99,672**	**99,679**
(% 0,8)	kob	423	324	278	270	256	252	200	82
	log(kob)	2,626	2,511	2,444	2,431	2,408	2,401	2,301	1,914
	Logaritmik azalma	2,374	2,489	2,556	2,569	2,592	2,599	2,699	3,086
	Logaritmik yüzde azalma	**99,577**	**99,676**	**99,722**	**99,730**	**99,744**	**99,748**	**99,800**	**99,918**
(% 1,2)	kob	384	204	198	180	176	174	147	27
	log(kob)	2,584	2,310	2,297	2,255	2,246	2,241	2,167	1,431
	Logaritmik azalma	2,416	2,690	2,703	2,745	2,754	2,759	2,833	3,569
	Logaritmik yüzde azalma	**99,616**	**99,796**	**99,802**	**99,820**	**99,824**	**99,826**	**99,853**	**99,973**

Çizelge 4.10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki iyodinin ve tek konsantrasyondaki perasetik asit ve gluteraldehitin spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}**							
Konsantrasyon	**İyodin**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(12,5 ppm)	kob	537	482	444	400	388	384	354	293
	log(kob)	2,730	2,683	2,647	2,602	2,589	2,584	2,549	2,467
	Logaritmik azalma	2,270	2,317	2,353	2,398	2,411	2,416	2,451	2,533
	Logaritmik yüzde azalma	**99,463**	**99,518**	**99,556**	**99,600**	**99,612**	**99,616**	**99,646**	**99,707**
(25 ppm)	kob	721	661	604	578	479	459	321	204
	log(kob)	2,858	2,820	2,781	2,762	2,680	2,662	2,507	2,310
	Logaritmik azalma	2,142	2,180	2,219	2,238	2,320	2,338	2,493	2,690
	Logaritmik yüzde azalma	**99,279**	**99,339**	**99,396**	**99,422**	**99,521**	**99,541**	**99,679**	**99,796**
(37,5 ppm)	kob	856	778	750	744	669	501	496	467
	log(kob)	2,932	2,891	2,875	2,872	2,825	2,700	2,695	2,669
	Logaritmik azalma	2,068	2,109	2,125	2,128	2,175	2,300	2,305	2,331
	Logaritmik yüzde azalma	**99,144**	**99,222**	**99,250**	**99,256**	**99,331**	**99,499**	**99,504**	**99,533**
Konsantrasyon	**Perasetik asit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 4,0)	kob	90	54	24	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,954	1,732	1,380	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,046	3,268	3,620	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,910**	**99,946**	**99,976**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Gluteraldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 2,0)	kob	9800	9300	8900	7200	5800	4200	3500	2710
	log(kob)	3,991	3,968	3,949	3,857	3,763	3,623	3,544	3,433
	Logaritmik azalma	1,009	1,032	1,051	1,143	1,237	1,377	1,456	1,567
	Logaritmik yüzde azalma	**90,200**	**90,700**	**91,100**	**92,800**	**94,200**	**95,800**	**96,500**	**97,290**

Çizelge 4.10 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} için uygulanan tek konsantrasyondaki formaldehitin, klorhekzidin diasetatın ve setilpiridinyum klorürün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}**							
Konsantrasyon	**Formaldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,8)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorhekzidin diasetat**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	450	380	250	174	85	41	25	7
	log(kob)	2,653	2,580	2,398	2,241	1,929	1,613	1,398	0,845
	Logaritmik azalma	2,347	2,420	2,602	2,759	3,071	3,387	3,602	4,155
	Logaritmik yüzde azalma	**99,550**	**99,620**	**99,750**	**99,826**	**99,915**	**99,959**	**99,975**	**99,993**
Konsantrasyon	**Setilpiridinyum klorür**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	200	70	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	2,301	1,845	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,699	3,155	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,800**	**99,930**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4. 11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki klorin dioksit ve fenolün spor eliminasyon sonuçları

Sporosidal Ajan		***G. thermoglucosidans* B84a**							
Konsantrasyon	**Klorin dioksit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(200 ppm)	kob	15	10	7	5	3	2	2	1
	log(kob)	1,176	1,000	0,845	0,699	0,477	0,301	0,301	0,000
	Logaritmik azalma	3,824	4,000	4,155	4,301	4,523	4,699	4,699	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,985**	**99,990**	**99,993**	**99,995**	**99,997**	**99,998**	**99,998**	**99,999**
(400 ppm)	kob	5	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,699	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,301	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,995**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(600 ppm)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Fenol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	50	30	20	10	0	0	0	0
	log(kob)	1,699	1,477	1,301	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,301	3,523	3,699	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,950**	**99,970**	**99,980**	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,0)	kob	40	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,602	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,398	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,960**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,5)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki sodyum hipokloritin ve m-krezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermoglucosidans* B84a**							
Konsantrasyon	**NaOCl**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(20 ppm)	kob	10	7	3	2	1	0	0	0
	log(kob)	1,000	0,845	0,477	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,000	4,155	4,523	4,699	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,990**	**99,993**	**99,997**	**99,998**	**99,999**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(40 ppm)	kob	3	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,477	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,523	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,997**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(60 ppm)	kob	1	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,999**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**krezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,5)	kob	40	20	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,602	1,301	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,398	3,699	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,960**	**99,980**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,0)	kob	20	10	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,301	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,699	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,980**	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,5)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki nitrik asit ve klorokrezolün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermoglucosidans* B84a**							
Konsantrasyon	**HNO_3**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 1,0)	kob	50	10	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,699	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,301	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,950**	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 2,0)	kob	10	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 3,0)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorokrezol**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,4)	kob	10	5	3	2	0	0	0	0
	log(kob)	1,000	0,699	0,477	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,000	3,301	3,523	3,699	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,900**	**99,950**	**99,970**	**99,980**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 0,8)	kob	1	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(% 1,2)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan üç farklı konsantrasyondaki iyodinin ve tek konsantrasyondaki perasetik asitin ve gluteraldehitin spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermoglucosidans* B84a**							
Konsantrasyon	**İyodin**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(12,5 ppm)	kob	5	3	2	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,699	0,477	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,301	3,523	3,699	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,950**	**99,970**	**99,980**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(25 ppm)	kob	2	1	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,301	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,699	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,980**	**99,990**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
(37,5 ppm)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Perasetik asit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 4,0)	kob	17	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,230	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	2,770	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,830**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Gluteraldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 2,0)	kob	204	120	98	74	24	8	0	0
	log(kob)	2,310	2,079	1,991	1,869	1,380	0,903	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	1,690	1,921	2,009	2,131	2,620	3,097	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**97,960**	**98,800**	**99,020**	**99,260**	**99,760**	**99,920**	**100,000**	**100,000**

Çizelge 4.11 *G. thermoglucosidans* B84a için uygulanan tek konsantrasyondaki formaldehitin, klorhekzidin diasetatın ve setilpiridinyum klorürün spor eliminasyon sonuçları (devam)

Sporosidal Ajan		***G. thermoglucosidans* B84a**							
Konsantrasyon	**Formaldehit**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,8)	kob	0	0	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Klorhekzidin diasetat**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	54	23	12	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,732	1,362	1,079	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,268	3,638	3,921	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,946**	**99,977**	**99,988**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**
Konsantrasyon	**Setilpiridinyum klorür**	**1 dk**	**2 dk**	**5 dk**	**10 dk**	**15 dk**	**20 dk**	**25 dk**	**30 dk**
(% 0,05)	kob	10	5	0	0	0	0	0	0
	log(kob)	1,000	0,699	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Logaritmik azalma	3,000	3,301	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
	Logaritmik yüzde azalma	**99,900**	**99,950**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**	**100,000**

4.3.1 Yüksek etkinlik gösteren sporsidal ajanların LD_{50} değerlerinin belirlenmesi

Tez kapsamında çalışılan 12 adet dezenfektan özellikli sporisidal ajan arasından iki tanesi (nitrik asit ve perasetik asit) en düşük konsantrasyonda ve en kısa temas süresinde etkinlik gösterdikleri ve ayrıca insan sağlığına ve çevreye en az zarar verdikleri için seçilmişlerdir. Bölüm 3.2.4.1'de yürütülen çalışma sonrasında belirlenen nitrik asit ve perasetik asitin DSM 2641^T için belirlenen LD_{50} değerleri çizelge 4.12, DSM 465^T için saptanan LD_{50} dozları da çizelde 4.13'te sunulmuştur.

Çizelge 4.12 *A. flavithermus* DSM 2641^T suşu üzerinde perasetik asit ve nitrik asitin farklı konsantrasyonlarının sporisidal etkinlikleri ve LD50 değerleri (Probit analizi)

Nitrik asit konsantrasyonları (µg)	**Başlangıç Spor Konsantrasyonu**	**Uygulama sonucu sayılan spor**	**Mortalite**	
33,12	100000	10000	90000	
66,23	100000	9000	91000	
132,47	100000	7500	92500	LD_{50}
264,94	100000	3400	96600	**1,801 µg**
529,88	100000	1200	98800	
1059,75	100000	87	99913	
2119,5	100000	36	99964	
4239	100000	22	99978	
Perasetik asit konsantrasyonları (µg)	**Başlangıç Spor Konsantrasyonu**	**Uygulama sonucu sayılan spor**	**Mortalite**	
4600	100000	23000	77000	
2300	100000	12000	88000	
1150	100000	330	99670	LD_{50}
575	100000	81	99919	**18,88 µg**
287,5	100000	55	99945	
143,75	100000	15	99985	
71,88	100000	8	99992	
35,94	100000	3	99997	

Çizelge 4. 13 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} suşu üzerinde perasetik asit ve nitrik asitin farklı konsantrasyonlarının sporisidal etkinlikleri ve LD50 değerleri (Probit analizi)

Nitrik asit konsantrasyonları (µg)	**Başlangıç Spor Konsantrasyonu**	**Uygulama sonucu sayılan spor**	**Mortalite**	
33,12	100000	21000	79000	
66,23	100000	2300	97700	
132,47	100000	600	99400	LD_{50}
264,94	100000	373	99627	**10,473 µg**
529,88	100000	42	99958	
1059,75	100000	0	100000	
2119,5	100000	0	100000	
4239	100000	0	100000	
Perasetik asit konsantrasyonları (µg)	**Başlangıç Spor Konsantrasyonu**	**Uygulama sonucu sayılan spor**	**Mortalite**	
4600	100000	12500	87500	
2300	100000	510	99490	
1150	100000	167	99833	LD_{50}
575	100000	10	99990	**15,92 µg**
287,5	100000	0	100000	
143,75	100000	0	100000	
71,88	100000	0	100000	
35,94	100000	0	100000	

DSM 2641^{T} için nitrik asit ve perasetik asitin LD_{50} değerleri 1,801 µg ile 18,88 µg blunurken, DSM 465^{T} suşu için bu değerler sırasıyla 10,473 µg ve 15,92 µg olarak hesaplanmıştır. Belirlenen LD_{50} değerleri, Bölüm 4.3.2 başlığı altında perasetik asitin ve nitrik asitin ikili kombinasyonları için bu kimyasalların biraradayken verdikleri sinerjistik/antagonistik yanıtların değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

4.3.2 LD_{50} değerleri belirlenen sporsidal ajanların kombine etkinliklerinin belirlenmesi

Seçilmiş olan iki adet sporisidal ajanın farklı konsantrasyonlarıyla yürütülen ikili kombinasyonlarının etkinliklerinin belirlenmesi için yapılan deneyler Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı şekliyle uygulanmıştır. DSM 2641^T için ikili kombinasyon yanıtları çizelge 4.14'te, DSM 465^T için ise çizelge 4.15'da sunulmuştur.

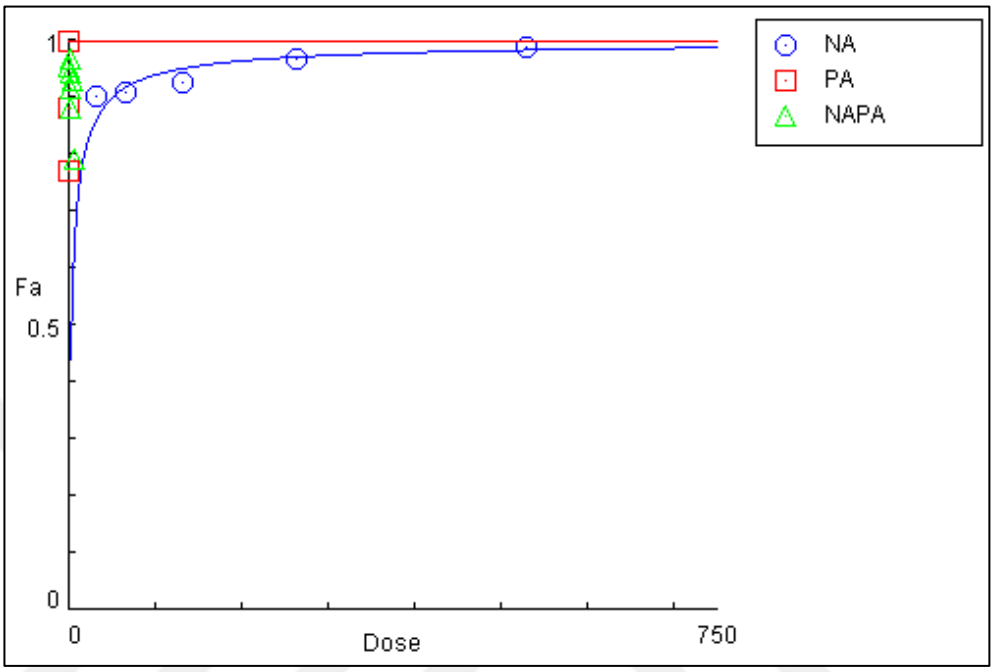
Çizelge 4. 14 *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun sporları üzerinde LD50 dozlarına göre denenilen nitrik asit ve perasetik asit kombinasyonları ve yanıtları

A. flavithermus DSM 2641^T					
Nitrik asit konsantrasyonları (µg)	**Nitrik asit doz yanıt etkileri**	**Perasetik asit konsantrasyonları (µg)**	**Perasetik asit doz yanıt etkileri**	**Nitrik asit-Perasetik asit kombinasyonları (LD_{50} dozlarına göre)**	**Kombine doz yanıt etkileri**
33,12	0,900	35,94	0,770	1:1	0,954
66,23	0,910	71,88	0,880	1:2	0,968
132,47	0,925	143,75	0,997	2:1	0,943
264,94	0,966	287,5	0,999	1:3	0,917
529,88	0,988	575	0,999	3:1	0,931
1059,75	0,999	1150	1,000	1:4	0,880
2119,5	1,000	2300	1,000	4:1	0,790
4239	1,000	4600	1,000		

Çizelge 4. 15 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun sporları üzerinde LD50 dozlarına göre denenilen nitrik asit ve perasetik asit kombinasyonları ve yanıtları

G. thermodenitrificans DSM 465^T					
Nitrik asit konsantrasyonları (µg)	**Nitrik asit doz yanıt etkileri**	**Perasetik asit konsantrasyonları (µg)**	**Perasetik asit doz yanıt etkileri**	**Nitrik asit-Perasetik asit kombinasyonları (LD_{50} dozlarına göre)**	**Kombine doz yanıt etkileri**
33,12	0,790	35,94	0,875	1:1	0,984
66,23	0,977	71,88	0,995	1:2	0,989
132,47	0,994	143,75	0,998	2:1	0,990
264,94	0,996	287,5	1,000	1:3	0,990
529,88	1,000	575	1,000	3:1	0,992
1059,75	1,000	1150	1,000	1:4	0,990
2119,5	1,000	2300	1,000	4:1	0,993
4239	1,000	4600	1,000		

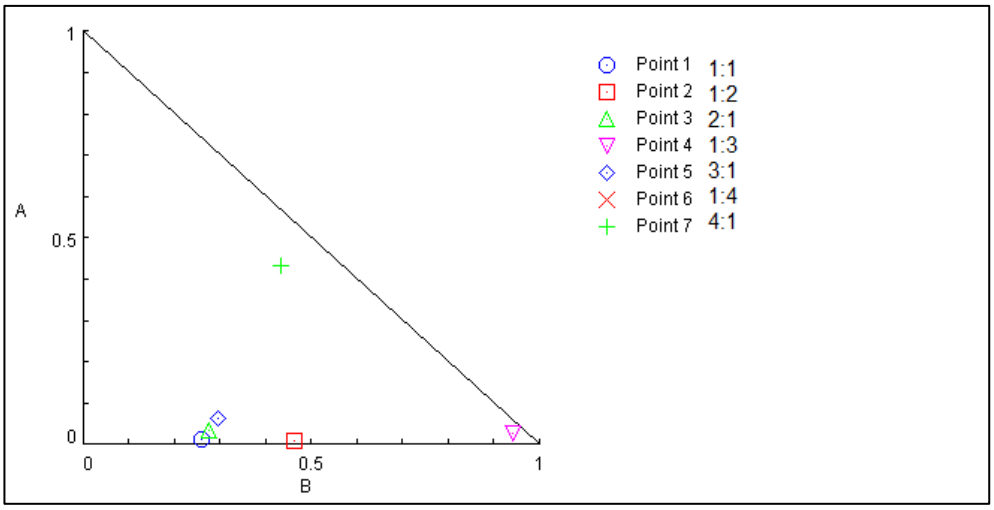
Ayrıca, DSM 2641^{T} için nitrik asit, perasetik asit ve ikili kombinasyonlarının doz yanıt eğrileri ve bununla ilişkili isoblogram sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'de, DSM 465^{T} için ise bu sonuçlar yine sırasıyla şekil 4.11 - 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 9 Nitrik asit, perasetik asit ve nitrik asit-perasetik asit kombinasyonlarının doz yanıt eğrisi (*A. flavithermus* DSM 2641^{T}) NA; Nitrik Asit, PA; Perasetik Asit, NAPA; İkili Kombinasyon

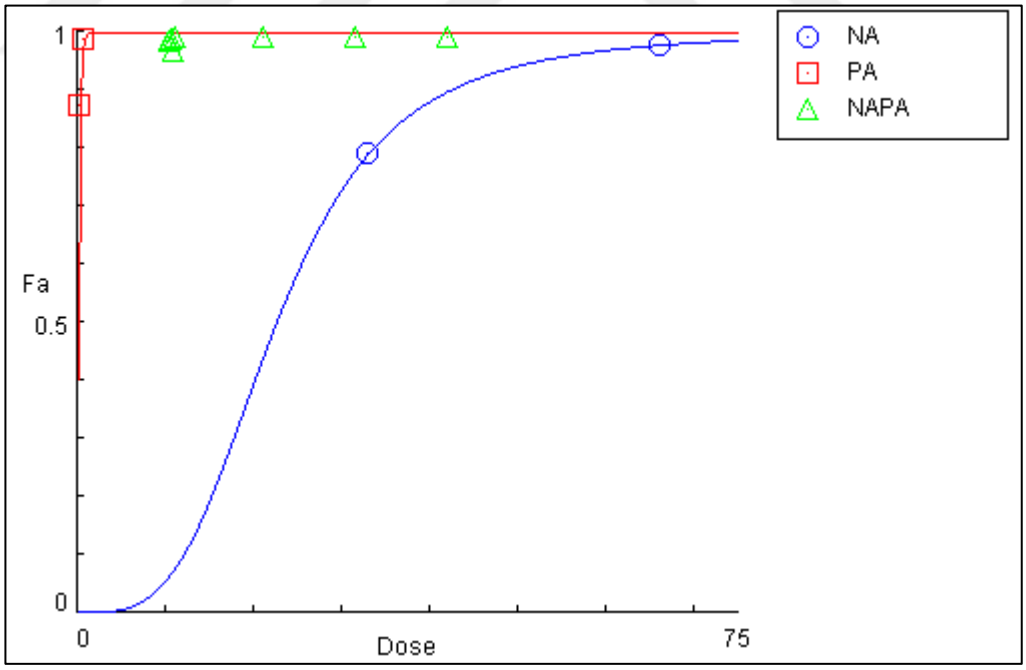
Doz yanıt eğrisi değerlendirildiğinde, *A. flavithermus* DSM 2641^{T} sporlarının ikili asit kombinasyonu uygulamasıyla elimine edilmesinden elde edilen eğirinin eğiminin perasetik asite daha yakın olması, perasetik asitin bu suşun sporları üzerinde daha etkin olduğunu göstermektedir.

.



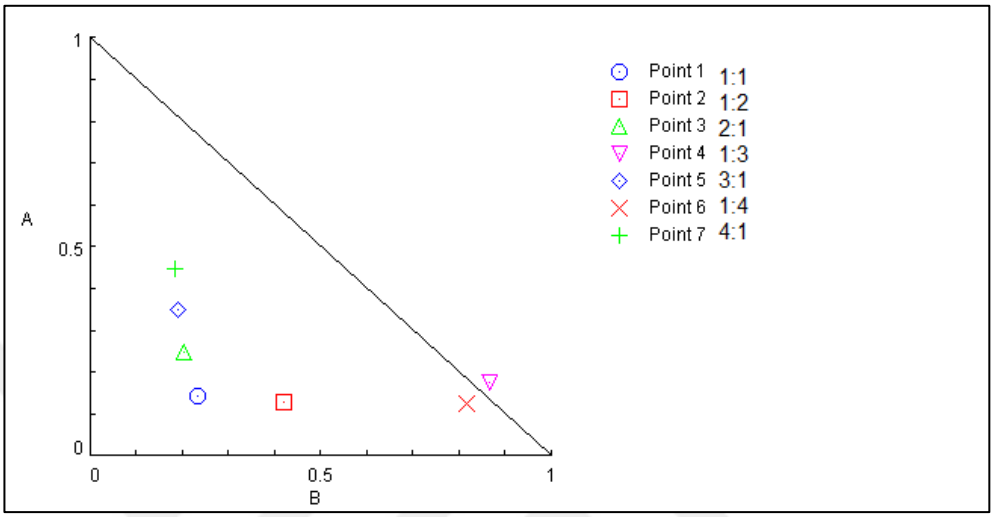
Şekil 4. 10 Nitrik asit- perasetik asit kombinasyonlarının isobolegramı (*A. flavithermus* DSM 2641^{T})

Grafikteki noktalar anlamlı etkileşim gösteren her bir kombinasyona işaret etmektedir ve bu noktaların referans çizgisinin sol tarafında olması (CI ;kombinasyon indeksi < 1) sinerjizme işaret etmektedir.



Şekil 4. 11 Nitrik asit, perasetik asit ve nitrik asit-perasetik asit kombinasyonlarının doz yanıt eğrisi (*G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}) NA; Nitrik Asit, PA; Perasetik Asit, NAPA; İkili Kombinasyon

Doz yanıt eğrisi değerlendirildiğinde, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T sporlarının ikili asit kombinasyonuyla elimine edilmesinde perasetik asitin yine sporlar üzerinde daha etkin olduğu saptanmıştır. Zira kombinatif uygulamanın perasetik asit eğimine daha yakın olduğu görülmektedir.

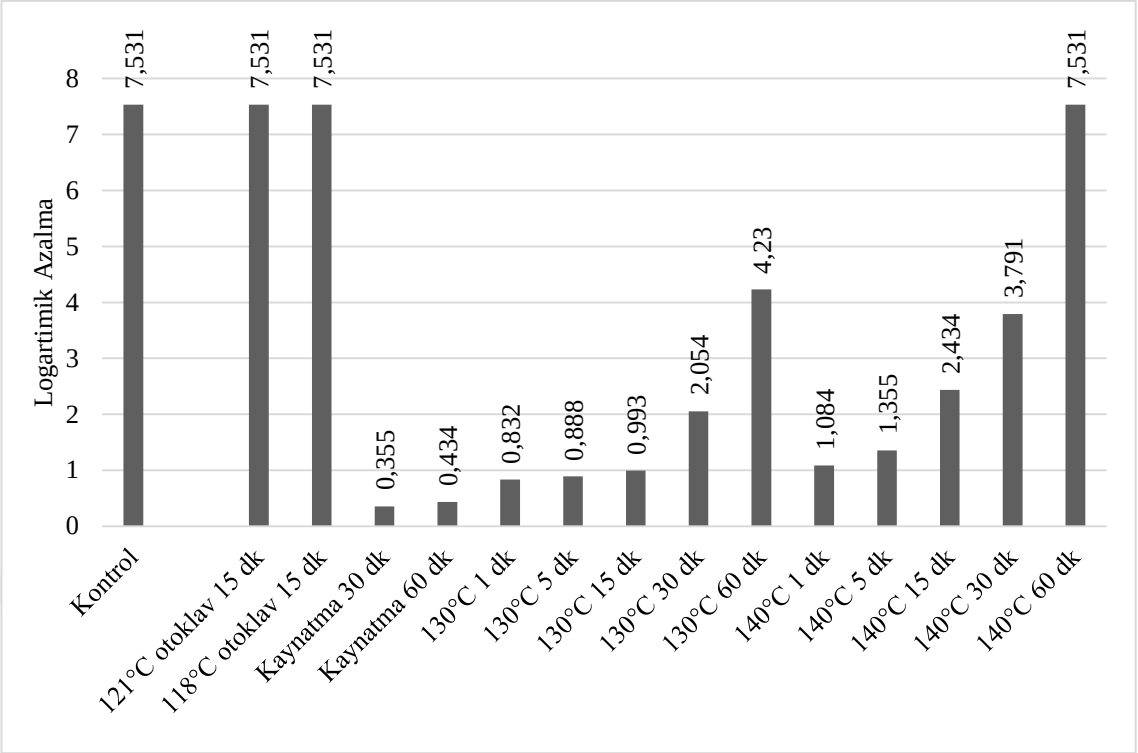


Şekil 4.12 Nitrik asit- perasetik asit kombinasyonlarının isobolegramı (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T)

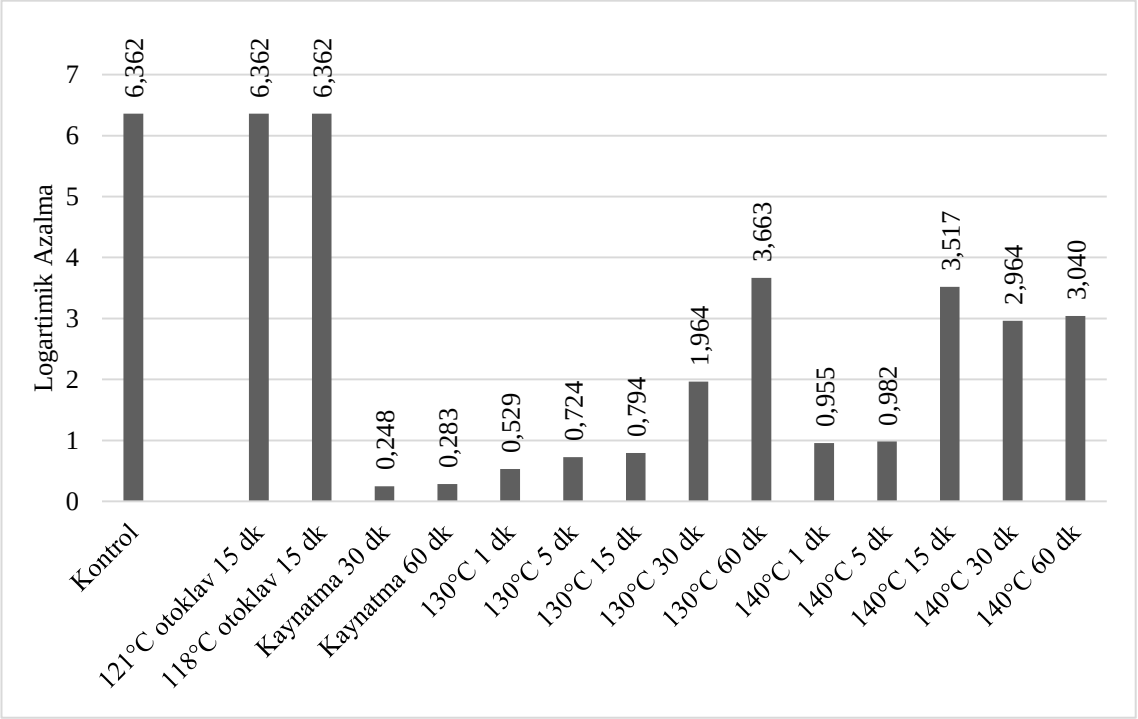
G. thermodenitrificans DSM 465^T sporlarının eliminasyonunda ikili olarak test edilen ajanların birçok kombinasyon (1:4,1:3 dışında) oranlarında net bir şekilde sinerjetik bir etkileşimlerinin olduğu görülmektedir.

4.4 Biyofilm Sistemlerindeki Sporlar ile Vejetatif hücrelerin ve Planktonik Durumdaki Sporların Isıl İnaktivasyon Yanıtları

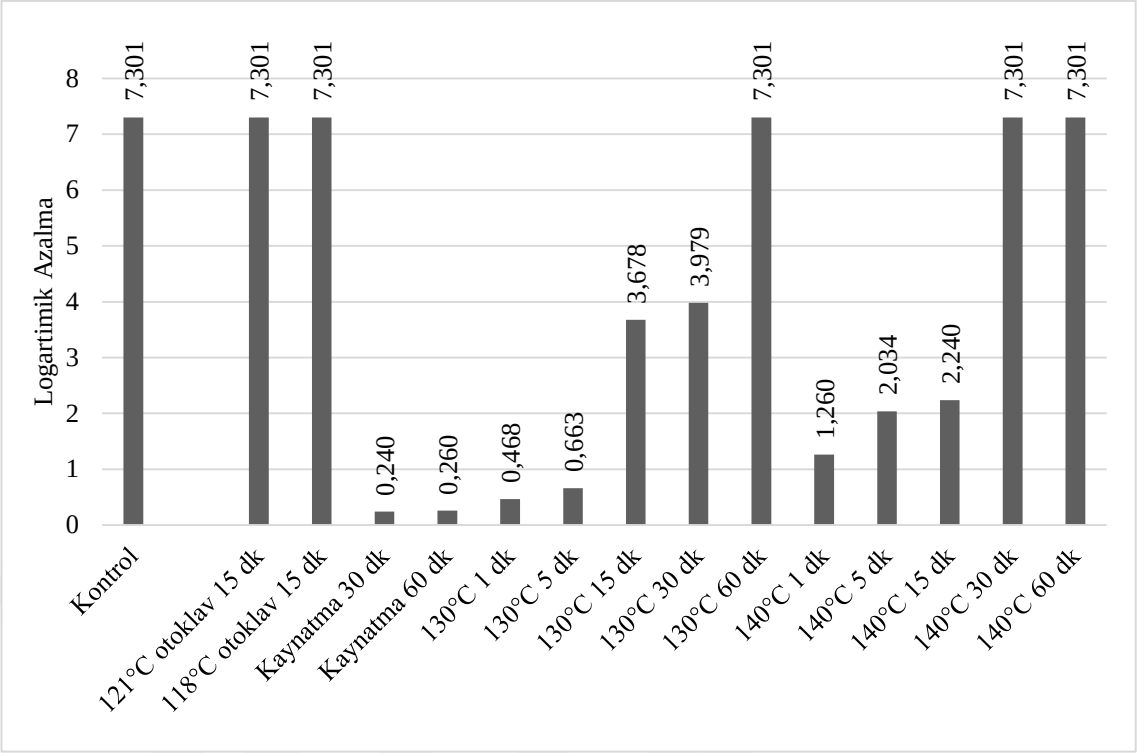
Bölüm 3.2.5'de *A. flavithermus* DSM 2641^T için planktonik fazda ki sporlara uygulanan ısıl inaktivasyon sonuçları Şekil 4.13'te biyofilm fazındaki sporlara olan etkisinin sonuçları ise Şekil 4.14'te verilmiştir. *G. thermodenitrificans* DSM 245^T için planktonik fazdaki sporlara uygulanan sıcaklıkların sonuçları ise Şekil 4.15'te, biyofilm fazındaki sporlara olan etkisinin sonuçları ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



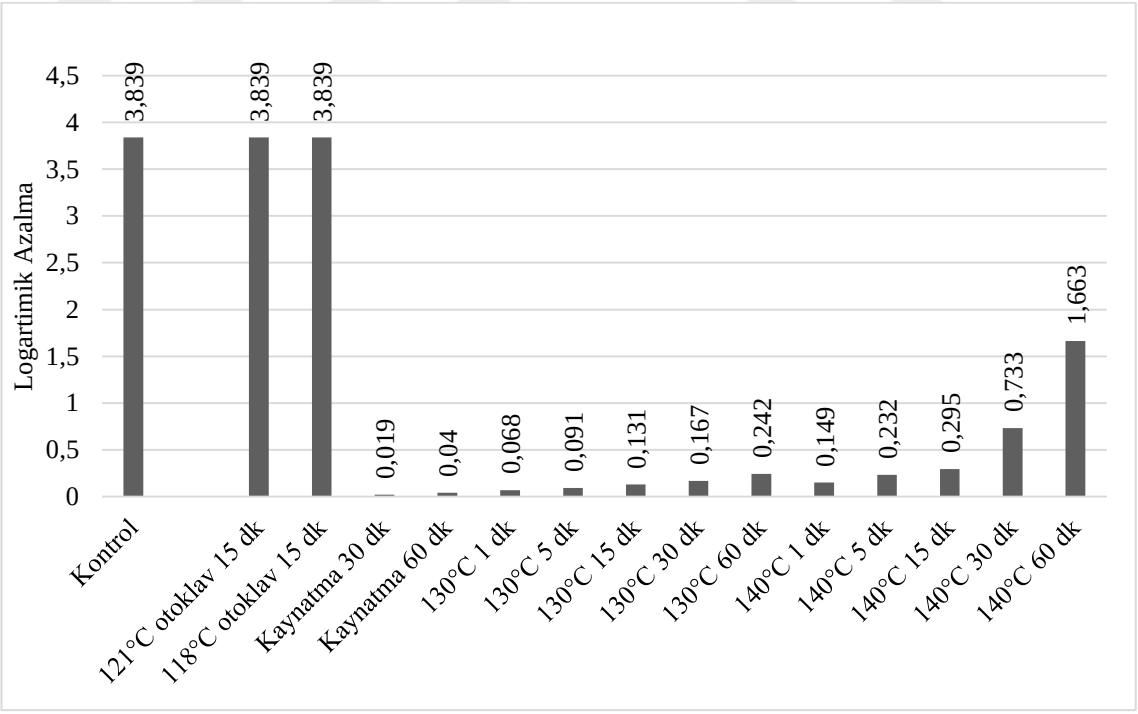
Şekil 4. 13 Sıcaklık uygulamalarının *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'in planktonik fazdaki sporlarının üzerindeki etkisi



Şekil 4. 14 Sıcaklık uygulamalarının *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'in biyofilm fazındaki sporlarının üzerindeki etkisi



Şekil 4. 15 Sıcaklık uygulamalarının *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'in planktonik fazdaki sporlarının üzerindeki etkisi



Şekil 4. 16 Sıcaklık uygulamalarının *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'in biyofilm fazındaki sporlarının üzerindeki etkisi

Isıl inaktivasyonun *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'un plantonik ve biyofilm fazlarındaki sporlarına etkisi Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'da *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'a etkiside Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Her iki referans türün biyofilm ve planktonik fazdaki sporlarına uygulanan ısıl inaktivasyonla ilgili sonuçlara göre, *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'in planktonik fazdaki sporlarının sadece 121 °C ve 118 °C'de nemli sıcaklıkla 15 dakika sterilizasyonda ve UHT teknolojisinde kullanılan sıcaklık olan 140°C'nin sadece 30 ve 60. dakika denemelerinde tamamen giderilebildiği görülmüştür. *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'in planktonik fazdaki sporları daha da dirençli olup, 121 °C ve 118 °C'de 15 dakika sterilizasyonda ve 140 °C'nin bir tek 60 dakika muamelesinde elimine edilebilmiştir.

4.5 Statik Koşullarla Biyofilm Örnekleri Üzerinde Seçilmiş Olan 15 adet Giderim Ajanının Eliminasyon Sonuçları

Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekliyle yürütülmüş olan 15 adet yerinde temizlik elemanı ile yapılan uygulamaların sonuçlarından, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *A. flavithermus* DSM 2641^{T} için olanları çizelge 4.16'de, *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} ve *G. thermoglucosidans* B84a için olanları ise Çizelge 4.17'de gösterilmiştr.

Dört sporlu termofilik basil arasından özellikle *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının paslanmaz çelik ve polipropilen yüzeylerinde geliştirilen biyofilm örneklerinde test edilen bütün kimyasal ve enzimatik sanitasyon ajanlarının (Çizelge 4.16) hiçbirinde gerek biyofilm örneklerinin gerekse biyofilm içerisindeki sporların eliminasyonu % 100 oranında sağlanamamıştır.

Süt ve süt ürünlerinin işlendiği endüstriyel ortamlarda daha önce de biyofilmleriyle sorun teşkil ettiği bilinen *A. flavithermus* DSM 2641^{T}, polivinil klorür ve polikarbonat yüzeylerdeki biyofilm örnekleri ve sporları, alkalen proteaz ve SDS kullanılarak %100 oranda giderilebilmiştir. Ayrıca, her iki yüzeyden de TCA ve triklosan ile sporlar tamamıyla elimine edilebilmiş, ancak biyofilm hücrelerinde bu başarı yakalanamamıştır. Sodyum metaperiodat kullanılarak ise, sadece polivinil klorür yüzeyinde gelişen

biyofilm sistemindeki biyofilm hücreleri ve sporlar %100 elimine edilmiş, fakat polikarbonat yüzeyde giderim oranları daha düşük kalmıştır (Çizelge 4.176.

Yine referans suşlardan *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}'in paslanmaz çelik ve polikarbonat yüzeylerdeki biyofilm sistemlerinde bulunan biyofilm hücreleri, hiçbir ajanla %100 başarıyla giderilememiş, ancak bu iki yüzey üzerinde oluşan biyofilmlerinden sadece sporlar, *tripsin* ile muamele sonrası %100 oranında giderilebilmiştir. Ayrıca, PMS-Sodyum tiyosülfat uygulaması sonrası polikarbonat yüzeyden ve sodyum metaperiodat muamelesi sonrası paslanmaz çelik yüzeyden sadece sporlar %100 elimine edilebilmiştir (Çizelge 4.17).

G. thermoglucosidans B84a izolatının paslanmaz çelik ve polikarbonat yüzeylerde geliştirilen biyofilmlerindeki sporları tripsin kullanılarak tamamıyla giderilebilmiş, SDS ve triklosan ile paslanmaz çelik yüzeyinde geliştirilen biyofilmlerinde sadece sporlar %100 elimine edilebilmiştir. Ayrıca, TCA ile paslanmaz çelik biyofilmlerinden gerek biyofilm hücreleri gerekse sporlar, polikarbonat biyofilmlerinden ise sadece sporlar %100 giderilebilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.16 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'nin %10'luk SKM içerisinde, iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**				***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**			
		Paslanmaz çelik		**Polipropilen**		**Polivinil klorür**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
Kontrol	kob/Toplam Yüzey Alanı	2400000	1600000	1050000	1000000	60000	40000	20000	4000
	kob/cm2	390244	260163	170732	162602	9756	6504	3252	650
	Log (kob/cm2)	**5,59**	**5,42**	**5,23**	**5,21**	**3,99**	**3,81**	**3,51**	**2,81**
Subtilizin	kob/Toplam Yüzey Alanı	365000	265000	400000	275000	47000	3100	7000	2950
	kob/cm2	59350	43089	65041	44715	7642	504	1138	480
	Log (kob/cm2)	**4,77**	**4,63**	**4,81**	**4,65**	**3,88**	**2,70**	**3,06**	**2,68**
	Logaritmik yüzde azalma	**84,79**	**83,44**	**61,90**	**72,50**	**21,67**	**92,25**	**65,00**	**26,25**
Alkalen Proteaz	kob/Toplam Yüzey Alanı	550000	300000	540000	255000	0	0	0	0
	kob/cm2	89431	48780	87805	41463	0	0	0	0
	Log (kob/cm2)	**4,95**	**4,69**	**4,94**	**4,62**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
	Logaritmik yüzde azalma	**77,08**	**81,25**	**48,57**	**74,50**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**
Selülaz	kob/Toplam Yüzey Alanı	900000	370000	130000	110000	16000	10000	13000	1000
	kob/cm2	146341	60163	21138	17886	2602	1626	2114	163
	Log (kob/cm2)	**5,17**	**4,78**	**4,33**	**4,25**	**3,42**	**3,21**	**3,33**	**2,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**62,50**	**76,88**	**87,62**	**89,00**	**73,33**	**75,00**	**35,00**	**75,00**
α-amilaz	kob/Toplam Yüzey Alanı	475000	400000	330000	400000	40000	32000	400	300
	kob/cm2	77236	65041	53659	65041	6504	5203	65	49
	Log (kob/cm2)	**4,89**	**4,81**	**4,73**	**4,81**	**3,81**	**3,72**	**1,81**	**1,69**
	Logaritmik yüzde azalma	**80,21**	**75,00**	**68,57**	**60,00**	**33,33**	**20,00**	**98,00**	**92,50**
Tripsin	kob/Toplam Yüzey Alanı	6900	4000	30000	26500	1000	500	1000	200
	kob/cm2	1122	650	4878	4309	163	81	163	33
	Log (kob/cm2)	**3,05**	**2,81**	**3,69**	**3,63**	**2,21**	**1,91**	**2,21**	**1,51**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,71**	**99,75**	**97,14**	**97,35**	**98,33**	**98,75**	**95,00**	**95,00**

Çizelge 4.16 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları (devam)

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**				***A.s flavithermus* DSM 2641^{T}**			
		Paslanmaz çelik		**Polipropilen**		**Polivinil klorür**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
Sodyum Dodesil Sülfat	kob/Toplam Yüzey Alanı	31500	9500	16000	12000	0	0	0	0
	kob/cm2	5122	1545	2602	1951	0	0	0	0
	Log (kob/cm2)	**3,71**	**3,19**	**3,42**	**3,29**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
	Logaritmik yüzde azalma	**98,69**	**99,41**	**98,48**	**98,80**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**
Trikloro Asetik Asit	kob/Toplam Yüzey Alanı	170000	100	750	500	300	0	100	0
	kob/cm2	27642	16	122	81	49	0	0	0
	Log (kob/cm2)	**4,44**	**1,21**	**2,09**	**1,91**	**1,69**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
	Logaritmik yüzde azalma	**92,92**	**99,99**	**99,93**	**99,95**	**99,50**	**100,00**	**99,97**	**100,00**
Furanon	kob/Toplam Yüzey Alanı	1100000	1000000	420000	340000	14000	3000	8000	100
	kob/cm2	178862	162602	68293	55285	2276	488	1301	16
	Log (kob/cm2)	**5,25**	**5,21**	**4,83**	**4,74**	**3,36**	**2,69**	**3,11**	**1,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**54,17**	**37,50**	**60,00**	**66,00**	**76,67**	**92,50**	**60,00**	**97,50**
Triklosan	kob/Toplam Yüzey Alanı	740000	320000	555000	200000	100	0	200	0
	kob/cm2	120325	52033	90244	32520	16	0	33	0
	Log (kob/cm2)	**5,08**	**4,72**	**4,96**	**4,51**	**1,21**	**0,00**	**1,51**	**0,00**
	Logaritmik yüzde azalma	**69,17**	**80,00**	**47,14**	**80,00**	**99,83**	**100,00**	**99,00**	**100,00**
Lizozim	kob/Toplam Yüzey Alanı	500	100	200000	120000	1000	100	10000	4000
	kob/cm2	81	16	32520	19512	163	16	1626	650
	Log (kob/cm2)	**1,91**	**1,21**	**4,51**	**4,29**	**2,21**	**1,21**	**3,21**	**2,81**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,98**	**99,99**	**80,95**	**88,00**	**98,33**	**99,75**	**50,00**	**0,00**

Çizelge 4.16 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları (devam)

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81**				***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**			
		Paslanmaz çelik		**Polipropilen**		**Polivinil klorür**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
0,5 M NaCl	kob/Toplam Yüzey Alanı	325000	840000	1000000	450000	30000	20000	17000	3000
	kob/cm2	52846	136585	162602	73171	4878	3252	2764	488
	Log (kob/cm2)	**4,72**	**5,14**	**5,21**	**4,86**	**3,69**	**3,51**	**3,44**	**2,69**
	Logaritmik yüzde azalma	**86,46**	**47,50**	**4,76**	**55,00**	**50,00**	**50,00**	**15,00**	**25,00**
1,0 M NaCl	kob/Toplam Yüzey Alanı	340000	485000	380000	240000	20000	10000	10000	1000
	kob/cm2	55285	78862	61789	39024	3252	1626	1626	163
	Log (kob/cm2)	**4,74**	**4,90**	**4,79**	**4,59**	**3,51**	**3,21**	**3,21**	**2,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**85,83**	**69,69**	**63,81**	**76,00**	**66,67**	**75,00**	**50,00**	**75,00**
PMS + Sodyum tiyosülfat	kob/Toplam Yüzey Alanı	800000	500000	370000	82000	22000	1200	11000	100
	kob/cm2	130081	81301	60163	13333	3577	195	1789	16
	Log (kob/cm2)	**5,11**	**4,91**	**4,78**	**4,12**	**3,55**	**2,29**	**3,25**	**1,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**66,67**	**68,75**	**64,76**	**91,80**	**63,33**	**97,00**	**45,00**	**97,50**
Sodyum metaperiodat	kob/Toplam Yüzey Alanı	245000	130000	440000	290000	0	0	300	200
	kob/cm2	39837	21138	71545	47154	0	0	49	33
	Log (kob/cm2)	**4,60**	**4,33**	**4,85**	**4,67**	**0,00**	**0,00**	**1,69**	**1,51**
	Logaritmik yüzde azalma	**89,79**	**91,88**	**58,10**	**71,00**	**100,00**	**100,00**	**98,50**	**95,00**
Nisin	kob/Toplam Yüzey Alanı	400	200	800	500	30000	22000	13000	1000
	kob/cm2	65	33	130	81	4878	3577	2113	162
	Log (kob/cm2)	**1,81**	**1,51**	**2,11**	**1,91**	**3,688**	**3,55**	**3,32**	**2,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,98**	**99,99**	**99,92**	**99,95**	**50,00**	**45,00**	**35,00**	**75,00**

Çizelge 4.17 *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} ve *G. thermoglucosidans* B84a'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***G. thermodenitrificans* DSM 465^{T}**				***G. thermoglucosidans* B84a**			
		Paslanmaz Çelik		**Polikarbonat**		**Paslanmaz Çelik**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
Kontrol	kob/Toplam Yüzey Alanı	1300000	120000	900000	115000	650000	28000	16000000	395000
	kob/cm2	211382	19512	146341	18699	105691	4553	2601626	64228
	Log (kob/cm2)	**5,33**	**4,29**	**5,17**	**4,27**	**5,02**	**3,66**	**6,42**	**4,81**
Subtilizin	kob/Toplam Yüzey Alanı	1000	300	8000	100000	950	200	79000	54500
	kob/cm2	163	49	1301	16260	154	33	12846	8862
	Log (kob/cm2)	**2,21**	**1,69**	**3,11**	**4,21**	**2,19**	**1,51**	**4,11**	**3,95**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,92**	**99,75**	**99,11**	**13,04**	**99,85**	**99,29**	**99,51**	**86,20**
Alkalen Proteaz	kob/Toplam Yüzey Alanı	1000	300	1000	200	1100	1000	39000	22000
	kob/cm2	163	49	163	33	179	163	6341	3577
	Log (kob/cm2)	**2,21**	**1,69**	**2,21**	**1,51**	**2,25**	**2,21**	**3,80**	**3,55**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,92**	**99,75**	**99,89**	**99,83**	**99,83**	**96,43**	**99,76**	**94,43**
Selülaz	kob/Toplam Yüzey Alanı	999500	41000	196000	113500	9500	1000	80000	16500
	kob/cm2	162520	6667	31870	18455	1545	163	13008	2683
	Log (kob/cm2)	**5,21**	**3,82**	**4,50**	**4,27**	**3,19**	**2,21**	**4,11**	**3,43**
	Logaritmik yüzde azalma	**23,12**	**65,83**	**78,22**	**1,30**	**98,54**	**96,43**	**99,50**	**95,82**
	kob/cm2	171	171	350	350	16260	114	43902	317
	Log (kob/cm2)	**2,23**	**2,23**	**2,54**	**2,54**	**4,21**	**2,06**	**4,64**	**2,50**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,92**	**99,13**	**99,76**	**98,13**	**84,62**	**97,50**	**98,31**	**99,51**
Tripsin	kob/Toplam Yüzey Alanı	100	0	100	0	100	0	200	200
	kob/cm2	16	0	16	0	16	0	33	33
	Log (kob/cm2)	**1,21**	**0,00**	**1,21**	**0,00**	**1,21**	**0,00**	**1,51**	**1,51**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,99**	**100,00**	**99,99**	**100,00**	**99,98**	**100,00**	**100,00**	**99,95**

Çizelge 4.17 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *G. thermoglucosidans* B84a'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları (devam)

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***G. thermodenitrificans* DSM 465^T**				***G. thermoglucosidans* B84a**			
		Paslanmaz Çelik		**Polikarbonat**		**Paslanmaz Çelik**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
Sodyum Dodesil Sülfat	kob/Toplam Yüzey Alanı	10500	10350	111000	3500	1000	0	41000	28500
	kob/cm2	1707	1683	18049	569	163	0	6667	4634
	Log (kob/cm2)	**3,23**	**3,23**	**4,26**	**2,76**	**2,21**	**0,00**	**3,82**	**3,67**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,19**	**91,38**	**87,67**	**96,96**	**99,85**	**100,00**	**99,74**	**92,78**
Trikloro Asetik Asit	kob/Toplam Yüzey Alanı	10000	4000	18500	7000	0	0	48000	0
	kob/cm2	1626	650	3008	1138	0	0	7805	0
	Log (kob/cm2)	**3,21**	**2,81**	**3,48**	**3,06**	**0,00**	**0,00**	**3,89**	**0,00**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,23**	**96,67**	**97,94**	**93,91**	**100,00**	**100,00**	**99,70**	**100,00**
Furanon	kob/Toplam Yüzey Alanı	160000	100	18000	13500	2850	100	110000	30000
	kob/cm2	26016	16	2927	2195	463	16	17886	4878
	Log (kob/cm2)	**4,42**	**1,21**	**3,47**	**3,34**	**2,67**	**1,21**	**4,25**	**3,69**
	Logaritmik yüzde azalma	**87,69**	**99,92**	**98,00**	**88,26**	**99,56**	**99,64**	**99,31**	**92,41**
Triklosan	kob/Toplam Yüzey Alanı	100	100	1400	200	600	0	1100000	135000
	kob/cm2	16	16	228	33	98	0	178862	21951
	Log (kob/cm2)	**1,21**	**1,21**	**2,36**	**1,51**	**1,99**	**0,00**	**5,25**	**4,34**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,99**	**99,92**	**99,84**	**99,83**	**99,91**	**100,00**	**93,13**	**65,82**
Lizozim	kob/Toplam Yüzey Alanı	10000	2100	100	100	10000	1650	1800	100
	kob/cm2	1626	341	16	16	1626	268	293	16
	Log (kob/cm2)	**3,21**	**2,53**	**1,21**	**1,21**	**3,21**	**2,43**	**2,47**	**1,21**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,23**	**98,25**	**99,99**	**99,91**	**98,46**	**94,11**	**99,99**	**99,97**

Çizelge 4.17 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *G. thermoglucosidans* B84a'nin %10'luk SKM içerisinde,iki ideal abiyotik yüzey üzerinde 60°C'deki statik koşullarda geliştirilen 48 saatlik biyofilm ve sporlarının kimyasal ajanlarla temas sonrası elde edilen biyofilm ve spor eliminasyon sonuçları (devam)

Giderim İçin Kullanılan Ajanlar	**Giderim Oranları**	***G. thermodenitrificans* DSM 465^T**				***G. thermoglucosidans* B84a**			
		Paslanmaz Çelik		**Polikarbonat**		**Paslanmaz Çelik**		**Polikarbonat**	
		Biyofilm	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**	**Biyofilm**	**Spor**
0,5 M NaCl	kob/Toplam Yüzey Alanı	1000000	2000	895000	4000	4000	100	215000	49000
	kob/cm2	162602	325	145528	650	2276	16	34959	7967
	Log (kob/cm2)	**5,21**	**2,51**	**5,16**	**2,81**	**3,36**	**1,21**	**4,54**	**3,90**
	Logaritmik yüzde azalma	**23,08**	**98,33**	**0,56**	**96,52**	**97,85**	**99,64**	**98,66**	**87,59**
1,0 M NaCl	kob/Toplam Yüzey Alanı	60000	100	500000	2650	300	200	38500	37500
	kob/cm2	9756	16	81301	431	49	33	6260	6098
	Log (kob/cm2)	**3,99**	**1,21**	**4,91**	**2,63**	**1,69**	**1,51**	**3,80**	**3,79**
	Logaritmik yüzde azalma	**95,38**	**99,92**	**44,44**	**97,70**	**99,95**	**99,29**	**99,76**	**90,51**
PMS + Sodyum tiyosülfat	kob/Toplam Yüzey Alanı	1000	100	23500	0	200	100	305000	55500
	kob/cm2	163	16	3821	0	33	16	49593	9024
	Log (kob/cm2)	**2,21**	**1,21**	**3,58**	**0,00**	**1,51**	**1,21**	**4,70**	**3,96**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,92**	**99,92**	**97,39**	**100,00**	**99,97**	**99,64**	**98,09**	**85,95**
Sodyum metaperiodat	kob/Toplam Yüzey Alanı	700	0	200	100	1800	200	37000	7450
	kob/cm2	114	0	33	16	293	33	6016	1211
	Log (kob/cm2)	**2,06**	**0,00**	**1,51**	**1,21**	**2,47**	**1,51**	**3,78**	**3,08**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,95**	**100,00**	**99,98**	**99,91**	**99,72**	**99,29**	**99,77**	**98,11**
Nisin	kob/Toplam Yüzey Alanı	200	100	400	300	5000	3000	100000	2000
	kob/cm2	33	16	65	49	813	488	16260	325
	Log (kob/cm2)	**1,51**	**1,21**	**1,81**	**1,69**	**2,91**	**2,69**	**4,21**	**2,51**
	Logaritmik yüzde azalma	**99,98**	**99,99**	**99,97**	**99,98**	**99,23**	**89,29**	**99,38**	**99,49**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt tozu üretiminde termofilik basillerin sporlarının mevcudiyeti, ile ilgili endüstride önemli bir problemdir (Murphy vd. 1999). *Geobacillus* spp. gibi termofilik bakterilerin sporları çiğ süt içerisinde düşük oranlarda yer almakta (McGuiggan vd. 2002) fakat; süt tozu gibi işlenmiş son ürünlerin içerisinde sıklıkla daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Bu sporların kaynağının, ısı değiştirici plakaların ve buharlaştırıcı plakaların üzerinde termofilik bakterilerin gelişmesinden dolayı olduğuna inanılmaktadır (Sacks vd. 1961). Çiğ süt içerisindeki sporlar, pastörizasyondan sürecinden kurtulduklarında ve uygun koşullar oluştuğunda, paslanmaz çelik yüzeylere yapışarak ve çimlenerek biyofilm oluşturur. Biyofilm olgunlaştıkça, hücreler ve sporlar biyofilmden koparak ürün içerisine dağılır (Flint vd. 2001a). Bakteriyal sporların oluştukları çevrede bulunan minerallere ve sahip oldukları düşük su aktivitesinin, ısıl dirençleri ile ilgili oldukları bilinmektedir (Beaman vd. 1982). Bunlara ek olarak, sporulasyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklığı, pH'ı ve ortam bileşenleri gibi koşulların spor direncine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Hill 2004). Magnezyum, kalsiyum ve potasyum gibi minerallerin varlığı bu süreçte önemli roller sergilemektedir. Bu mineraller, olgun spor gelişimi için önemli olmakla birlikte spor oluşum süreçlerini de teşvik etmektedir (Vinter 1969). Kalsiyum, spor oluşumunun başlangıcında sporun kor kısmında birikmektedir (Johnstone vd. 1994, Palop vd. 1999). Kalsiyum aynı zamanda sporulasyon sürecini başlatan genlerin ifadelerinde de artışa neden olmaktadır (Oomes vd. 2009). Mineral tuzları sporulasyon besiyerlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Cooney ve Freese 1976, Kaul ve Singh 1982, Warriner ve Waites 1999). Bu mineraller süt ürünleri içerisinde de bulundukları için termofilik basillerin sporulasyonunu fazına geçmelerini teşvik etmektedir (Holt 1985). Bu kanıt, süt içerisine ilave bazı minerallerin bulunduğu süt içerisinde de gelişen *Geobacillus* cinsi üyeleri için laboratuvar ölçekli bazı çalışmalarda sunulmuştur (Seale vd. 2008). Ancak, termofilik basillerde başarılı bir spor formasyonu için gereken süre, cinsler ve türler arasında çeşitlilik göstermektedir. Örneğin; bazı termofilik basiller mineral katkılı sporulasyon besiyerleri içerisinde bir haftada tamamen sporlanırken, bazı *Geobacillus* izolatları mineral katkılı ($CaCl_2$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ ya da $MgCl_2$) standart Triptik Soy Broth (TSB) içerisinde 12 ila 18 saatte ciddi oranda sporlanabilmektedir (10^5-10^7 spor/mL), (Seale vd. 2008).

Çalışmada kullanılan termofilik basillerin sporulasyonunu teşvik etmek amacı ile TBL, DSM1X ve DSM2X besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan bu besiyerlerinden, TBL'nin iyon içeriği $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ ve $CaCl_2$'dir. Bahsedilen bu tuzlar, literatürde sporulasyon besiyerlerinde, sporulasyonu teşvik etmek amaçlı sıklıkla kullanılmışlardır. Aynı şekilde DSM1X ve DSM2X içerisine ilave edilen $Ca(NO_3)_2$, $MnCl_2$ ve $FeSO_4$ tuzları da sporulasyonu teşvik etmek amaçlı kullanıldığı görülmüştür. Sporulasyon için kullanılan besiyerlerinde ciddi miktarda kalsiyum olduğu ve böylelikle çalışma sonrası elde edilen yüklü miktarda spor oranları da literatürde yapılmış çalışmaları doğrular niteliktedir. Ayrıca, Seale'ın (2018) yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak, bu çalışma kapsamında kullanılmış olan 4 farklı termofilik basilin 48 saatin sonunda yüksek oranda sporulasyona uğradığı görülmektedir (Çizelge 4.2).

Çok sayıda çalışma (Bos vd. 1999), vejetatif hücrelerin yüzeye tutunmasındaki fizikokimyasal özelliklerin rolünü değerlendirmiştir. Bununla birlikte, bu bilgilerin ne kadarının sporların yüzeye tutunması ile ilgili olduğu belirsizdir. Sporlar, metabolik olarak aktif olmadıkları için özellikle hareketsiz olmaları sebebiyle vejetatif hücrelerden farklıdırlar (Setlow vd. 2007, Nishihara vd. 1975). Termofilik bakterilerin yüzeye tutunma karakteristikleri daha önce yapılan bazı çalışmalarda (Flint 1997, Seale 2008) saptanmaya çalışılmıştır. Bununla birlikte, yüzeyin hidrofobikliğinin, hidrofilik yüzeylerden ziyade hidrofobik yapıya bağlanma eğiliminin daha yüksek olduğu, bağlanan sporların sayısı üzerinde bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Rönner vd. 1990). Hidrofobikliğin oranı arttıkça, sporların hem hidrofobik hem de hidrofilik yüzeylere yapışmasının daha büyük olduğu bildirilmiştir (Rönner vd. 1990). Bakteri hücrelerinin ve sporlarının tutunması, birçok faktörün içerisinde olduğu bir işlemdir. Yüzey özellikleri ve hücreler arasında ki kimyasal sinyalizasyon gibi fiziksel faktörleri içerir (Stickler 1997). Hidrofobik sporlar hidrofobik vejetatif hücrelere nazaran paslanmaz çeliğe daha fazla tutunurlar (Parkar vd. 2001). Süt içerisinde bulunan proteinler, termofilik basilin hem vejetatif hücrelerini hem de sporlarının tutunma oranlarını arttırırlar (Parkar vd. 2001). Mikrobiyal kolonizasyonunun boyutu, yüzeyin pürüzlü olması sebebiyle arttığı görülmüştür. Ayrıca, yüzeyin sahip olduğu elektriksel kuvvet ve yüzeyin ıslanabilirliği karşısında tutunma oranının değiştiği de görülmüştür. Paslanmaz

çelik ve cam gibi hidrofilik yüzeyler, kauçuk, teflon gibi hidrofobik yüzeylere nazaran daha fazla tutunmaya olanak sağladıkları da görülmüştür (Parkar vd. 2001).

Flint vd. (1998) yaptığı epifloresan mikroskobisinde yaptığı çalışmada, paslanmaz çelik yüzeyinde tutunan vejetatif hücreler incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, ağırlıklı olarak negatif yüklü olan bakteri hücresi, gene negatif yüklü olan yüzeye karşı herhangi bir çekilme kuvveti göstermemekte, aynı yüke sahip olduklarından dolayı birbirlerini itmektedirler. Ayrıca, yaptıkları bu çalışma da bakteri yüzeyindeki proteinlerin ilk tutunmada büyük rol oynadıklarını, tutunma öncesi denemelerde yaptıkları yüzey proteinlerini kaldırmaya yönelik kimyasal uygulamalar ile göstermişlerdir.

Epifloresan mikroskobisinde ve saf spor stokları kullanılarak yürütülen deneyler ile (Bölüm 3.2.4), süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı yerlerde sıklıkla kullanılan 6 farklı yüzey (paslanmaz çelik, polivinilklorür, polipropilen, polikarbonat, teflon ve kauçuk) üzerinde sporların tutunma desenleri incelenmiştir. 4 termofilik basilin sporları hem sayım yöntemi hem de epifloresan mikroskobisinde incelendiğinde, 6 yüzey arasından tamamına yaklaşık olarak 10^6 oranında tutunanan tek termofilik basilin *A. flavithermus* DSM 2641^T'in olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre, *A. flavithermus*'un sporlarının yüksek derecede hidrofobik olan polivinilklorür, polikabonat, polipropilen, kauçuk ve teflona, ayrıca bulunduğu ortama göre yüzey karakteristiği değişken olan (hidrofobik/hidrofilik) paslanmaz çeliğe yüzey karakteristiğinden bağımsız olarak tutunduğu söylenebilir. Sporların yüzey karakteristikleri genelde hidrofilik karakterde oldukları ve elde edilen yeni bulgulardan yola çıkarak, *A. flavithermus* DSM 2641^T' dışında, kauçuk yüzeyine en yüksek oranda tutunma gösteren sporların *G. thermoglucosidans* B84a'nın ve teflon yüzeyinde en yüksek tutunma gösteren sporların ise *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in olduğu görülmektedir. Bir genelleme yapmak gerekirse, termofilik sporların tutunmak için seçtikleri yüzeylerin tamamen türe özgü olarak değiştiği ve doğrudan bir yüzey tercih genellemesi yapılamayacağı söylenebilir. Bunun dışında 4 bakteriye ait 10^7 spor/mL'lik stoklardan özellikle *A. flavithermus* DSM 2641^T'nin (4,8-6,1 kob/mL), (Bölüm 4.2 Çizelge 4.3- 4.8) ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in (4,0-5,7 logK kob/mL), (Bölüm 4.2 Çizelge 4.3- 4.8) tüm yüzeylere oldukça fazla adhezif özellik göstererek,

tekrar vejetatif forma dönüşüp gelişebildikleri, bu nedenle de süt ve süt ürünleri içeren ortamlarda ciddi sorunlar teşkil edebilecekleri ön görülmüştür. Adhezif özelliği ve en düşük spor sayım sonucu ise tüm yüzeylerde 3,3-4,1 log(kob/mL)'lik konsantrasyonlarda koloniler oluşturan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 türüne aittir (Bölüm 4.2 Çizelge 4.3- 4.8).

Bakteriyal sporlar kimyasal ajanlara ve fiziksel uygulamalara karşı yüksek derecede direnç profili sergiler (Russel 1990). Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında termofilik bakterilerin sporlarının, kimyasal ajanlara karşı olan direncinin araştırılmadığı, daha çok mezofilik bakterilerin sporlarının kimyasal ajanlara özellikle de sporisidal ajanlara karşı dirençleri üzerine araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Örneğin, Sykes (1970), *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus stearothermophilus* üzerine yaptığı çalışmalar ile fenolün, klorhekzidin diglukonatın, gluteraldehitin, hidroklorik asitin, klorin gazı açığa çıkan bileşiklerin ve iyodinin etkisini incelemiştir. Bunlara ek olarak, sıcaklığın sporlar üzerindeki etkisine bakmıştır. Briggs ve Yazdany (1974) ise araştırmalarında, klorokrezol ve benzalkoniyum kloridin *B. pumilus* ve *B. stearothermophilus* sporları üzerindeki etkinliğinin çok az olduğunu belirtmişlerdir. Young ve Setlow (2003)'un yaptıkları çalışmalarla, *B. subtilis* sporları 2,5 µg/mL (pH:11.0) ve 50 µg/mL (pH:7.0) hipokloritle veya 10-14 µg/mL (pH:3.5) klorin dioksite maruz bırakıldığında, üremede 3 log'luk bir düşüşün olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, *B. subtilis* sporları üzerinde klorin dioksitin, klorine göre daha fazla öldürücü etkisi olduğunu kanıtlamışlardır. Beuchat ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmalar ise, dezenfektanların ortaya çıkarttıkları oksitleyici reaksiyonların, ortamdaki organik madde varlığından etkilendiğini kanıtlamıştır. Bütün bunlara ek olarak, tez kapsamında test edilen sporisidal ajanların (Bölüm 3.2.5 Çizelge 3.54), literatür bilgilerine göre genellikle mezofilik bakterilerin sporları üzerinde denendikleri görülmektedir (Borick 1968, Briggs ve Yazdany 1974, Russell 1990, Knott vd. 1995, Sagripanti ve Bonifacino 1996a, Sagripanti ve Bonifacino 1996b, Reybrouck 1998, McDonnell ve Russell 1999, Young ve Setlow 2003, Beuchat vd. 2004, Maillard 2011).

Sporosidal ajanların 4 farklı termofilik türün sporları üzerine olan etkinlikleri üzerine yürütülen çalışma genel olarak değerlendirildiğinde, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T

ve *A. flavithermus* DSM 2641^T referans türlerin sporlarının, *G. thermoglucosidans* B84a ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81'in sporlarıyla kıyaslandıklarında, kullanılan kimyasal ajanlara karşı çok daha dirençli oldukları görülmektedir. Bu ajanlardan sadece perasetik asit, setilpridinium klorit ve formaldehit, 4 bakteriyel türün sporları üzerinde de etkili olmuştur. Ancak, bu ajanlardan bir kuaterner amonyum antiseptiği olan ve bazı durumlarda ilaç olarak da kullanılan setilpridinyum kloritin yüksek dozlarının toksik ve oldukça pahalı bir kimyasal olduğu bilinmektedir. Yine dezenfektan olan formaldehit sıvı halde renksiz ve kötü kokulu, zehirli bir kimyasal gaz olup, kanserojen etki gösterebilmektedir. Bu bağlamda, dört spora da etkili olan üç ajan içerisinden perasetik asit en az zararsız ajan olarak nitelendirilebilir. Yine, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T sporları dışında diğer üç basilin de sporlarını %100 elimine eden ve dezenfektan olarak kullanılan klorhekzidin diasetat ve nitrik asit karşılaştırıldığında, klorhekzidin diasetatın özellikle endüstriyel süreçlerde yerinde temizlik işlemleri (CIP) için oldukça maliyetli olacağı açıktır.

Dört bakteri türünün sporları üzerinde 10 dakikada etkin olan % 4,0'lük perasetik asit ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T sporları dışında (% 99,998 giderim) diğer üç basilin de sporlarını 30 dakikada elimine eden %3'lük nitrik asitin, termostabil sporlar üzerinde en düşük konsantrasyonda ve en düşük temas süresinde etkinlik sağlayabildikleri saptanmıştır (Çizelge 4.9-4.12). Aynı zamanda seçilen bu kimyasallardan perasetik asit; uygulama sonrası durulamaya gerekli olmayan özellikteki bozunabilir yapısı ile, tat koku veya toksik özellik göstermemesi nedeniyle zamandan ve maliyetten tasarruf edilmesini sağlar (Block 1991). Nitrik asit ise, özellikle süt endüstrisinde uygulanan yerinde temizlik rejimlerinde kullanılan en yaygın asittir (Bremer vd. 2006). Çalışma kapsamında test edilen kimyasal etken maddelere karşı sporları yüksek direnç gösteren iki adet referans suş modelleme çalışmasına dahil edilmiştir. Bu suşlar (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *A. flavithermus* 2641^T) gerek süt ürünlerinin işlendiği çevrelerden sıklıkla izole edilmeleri gerekse bir önceki çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak sporlarının yüksek direnç göstermelerinden ötürü değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma, seçilen sporisidal ajanlar esas alınarak iki farklı stratejiyle değerlendirilmiştir. Her iki strateji de bu ajanların birlikte kullanılmaları sonucunda daha etkin sporisidal sonuçların alınmasına imkân vermesi

açısından yürütülmüştür (Bölüm 3.2.5.2). Nitrik asit ve perasetik asitin etkinliklerinin ardışık sırayla değerlendirilmesi sonucunda, nitrik asit ve perasetik asitle her iki bakteri için de % 100 oranında spor eliminasyon etkinliği saptanmıştır. *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T perasetik asit ve nitrik asitin farklı konsantrasyonları denenerek bulunan LD_{50} değerleri baz alınarak, perasetik asit ve nitrik asitin kombine doz yanıt etkilerine bakılmıştır (Bölüm 4.3.2 Çizelge 4.15 ve 4.16). Elde edilen doz yanıt etkileri dikkate alınarak "Compusyn" yazılımı aracılığıyla (Chou 2010) gerçekleştirilen analiz sonuçları ve isoblogram modellemeleri Şekil 4.9-4.12 verilmiştir. Bu sonuçlara göre, şekil 4.10'da *A. flavithermus* DSM 2641^T sporlarının eliminasyonunda 1:3 ve 4:1 oranları hariç (yakın aditif etki) diğer ikili olarak test edilen ajanların kombinasyon oranlarında net bir şekilde sinerjetik bir etkileşim olduğu görülmektedir. Etken madde kombinasyonlarının değerlendirilmesi için geliştirilen Chou-Talalay metodu "mass-action" prensibinden köken alan "median-effect" eşitliğine dayanmaktadır. Chou-Talalay teorisine göre elde edilen kombinasyon indeksleri (CI) iki ya da daha fazla etken madde kombinasyonu arasındaki olası "aditif", "sinerjetik" ve "antagonistik" etkileşimlerin kantifiye edilmesine olanak sağlar (CI:1, aditif etki; CI<1, sinerjizm, CI>1, antagonizm). Elde edilen ise grafiktelerdeki noktalar, anlamlı etkileşim gösteren her bir kombinasyona işaret etmektedir ve bu noktaların referans çizgisinin sol tarafında olması (CI: kombinasyon indeksi<1) sinerjizme işaret etmektedir. 1:4 kombinasyonu yakın aditif etkiye işaret ederken, 1:3 kombinasyonu hafif antagonistik etkileşime işaret etmektedir.

Son yıllarda bakteriyel sporların termal inaktivasyonunu tanımlamak adına pek çok araştırma yapılmıştır (Gómez-Jódar vd. 2016, Stoeckel vd. 2016, Witthuhn vd. 2011). Çoğu termofilik bakterilerin sporları sadece UHT pastörizasyonu esnasında etkin bir şekilde öldürülebilir (>135°C, 2^8 saniye). Fakat, uygulanan bu ısıl işlem, ürün içindeki peynir altı suyu proteinlerinin değerli fraksiyonunun azaltılmasına yol açar (Elliott vd. 2005). Ortaya çıkan bir diğer problem ise protein agregasyonu nedeniyle konsantre süt veya peynir altı suyunun koagülasyonudur (Dumpler vd. 2015, Havea vd. 2009, Hinrichs 2000). Süt ve süt ürünlerinin içeriğinde bulunan k-kazeini, yüksek sıcaklıklarda konsantrasyon faktörlerine ayrışır (Anema 1998). Konsantre peynir altı suyu ürünleri için ortamın pH seviyesine ve mineral bileşimine bağlı olarak proteinler

arasında çapraz bağlanma meydana gelir (Havea vd. 2002). Kazein miseller, denatüre peynir altı suyu proteinleri ile etkileşime girdiğinde, yüksek sıcaklıklarda jel oluşumu meydana gelir ve oluşam bu jelimsi içerik bakteriyel sporların elimine edilmesini zorlaştırır.

Wedel ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada *A. flavithermus* için 110 °C'de 30 dakika boyunca ısıl işlem uygulamanın tüm sporları inaktive etmek için yeterli olduğunu göstermişlerdir. Fakat çalışma dahilinde kullanılan farklı bir *A. flavithermus* suşunun, 30 dakika 125 °C'ye maruz bırakılması sonunda canlı kaldığını gözlemlemişlerdir. Böylelikle ısıl direncin, suşun türüne ve hatta cinsine bağlı olduğunu söylemişlerdir (Wedel vd. 2018). Tez dahilinde yapılan denemeler sonucunda, *A. flavithermus* DSM 2641^{T} suşunun biyofilmlerinin ve planktonik haldeki sporlarının, farklı sıcaklıklarda ısıl işlemlere tabi tutulduğunda (30 dakika ve 60 dakika boyunca 100 °C'de kaynatma, 118 °C'de 15 dakika otoklavlama, 121 °C'de 15 dakika otoklavlama, kuru ısı bloğunda 135 °C ve 145 °C'de, 1, 5, 15, 30 ve 60 dakika bekletme) 121 °C ve 118 °C'de 15 dakika nemli sıcaklıkla sterilizasyonda ve 140 °C'nin bir tek 60 dakika boyunca muamelesinde giderildiği görülmüştür. Sonuçlar Wedel ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışma ile karşılaştırılacak olursa, çalışma dahilinde kullanınan *A. flavithermus* DSM 2641^{T} suşunun, yüksek sıcaklıklara uzun süre maruz bırakılmaya karşı daha dirençli olduğu açıkça görülmektedir.

Sadiq vd. (2016) *G. stearothermophilus* için yaptığı çalışmalar Wedel ve arkadaşlarının (2018) çalışmalarından farklılık arz etmektedir. Sadiq ve arkadaşlarının (2016) yürüttükleri çalışmalardaki üç suşun tamamı, sadece 30 dakika boyunca 110 °C'de 1.5 log'luk bir düşüş göstermiştir, fakat yaptıkları çalışmalar süt ve süt konsantresi içerisinde değil sadece su içerisinde gerçekleştirilmiştir. Wells-Bennik ve arkadaşları (2018), protein içeriği, mineral konsantrasyonu gibi gıda içeriklerinin, ortamın asit veya baz içeriğine bağlı pH konsantrasyonun, bakteriyel sporlar üzerindeki inaktivasyon özelliğinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini belirtmiştir. Yuan ve arkadaşlarının (2012) *A. flavithermus* ve *G. stearothermophilus* sporlarının üzerinde yaptığı çalışmalar ise, sporların 121 °C'de 15 saniye tutulması sonrası gelişimlerinin 6,36 log'dan 3,72 log'a düştüğünü göstermişlerdir. Tez çalışması kapsamında seçilen *G.*

thermodenitrificans DSM 465^{T} suşunun, sadece 121 °C ve 118 °C'de nemli sıcaklıkla 15 dakika sterilizasyonda ve 140 °C'nin ise sadece 30 ve 60. dakika uygulamalarında giderildiği görülmüş olup, literatürde yapılan çalışmalara göre çalışılan *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} tip suşunun daha dirençli olduğu söylenebilir. Isıl inaktivasyon işlemlerinden ve aynı zamanda UHT teknolojisinde kullanılan sıcaklık olan 140 °C'nin 60 dakika uygulamasında giderim olması ve bu uygulama süresi boyunca iki suşun da direnç göstermesi, neden süt ve süt ürünlerinin üretiminde yapılan sıcaklık uygulama aşamalarında kullanılan ekipmanlardan sıklıkla *Geobacillus* spp. ve *A. flavithermus*'un izole edildiğinin bir yanıtı mahiyetindedir.

Ayrıca, tez çalışmaları kapsamında elde edilen ısıl inaktivasyon sonuçlarına göre, çok yüksek bir sıcaklık olan 140 °C'de 30 dakika inaktivasyon yönteminin termostabil sporlara karşı öldürücü etki göstermediği kanıtlanmıştır. Beklenildiği üzere bu durum biyofilm fazındaki sporlarda daha da vahim bir hal almış ve her iki referans suşun sporları yalnızca 121 °C ve 118 °C'de nemli sıcaklıkla 15 dakika sterilizasyona dayanıksız bulunmuşlardır. Yine *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'in biyofilm içerisinde çok daha yoğun bir spor konsantrasyonu içermesi nedeniyle, spor eliminasyonunun daha zor olduğu görülmektedir. Sonuçlar, süt mevcudiyetinde biyofilm matriksine gömülü vaziyette bulunan bu termostabil basil sporlarının, planktonik fazdaki sporlara kıyasla, süt ve süt ürünleri işleyen tesislerde ne derece ciddi sorunlar yaratabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Hem endüstriyel hem de laboratuvar ölçekli sistemlerde kullanılan yerinde temizlik işlemlerinin etkinliği, yüzeye tutunmuş bakterilerin elimine edilmesinde farklılık gösterir (Austin ve Bergeron 1995, Faille vd. 2002, Dufour vd. 2004). Yerinde temizlik elemanlarının etkinliklerinin farklılık göstermesi, giderilmek istenilen biyofilm tabakasının kalınlığına ve olgunluğuna, temizlik maddesinin bileşimine ve sahip olduğu konsantrasyona, temizlik süresine, temizlik maddesinin uygulandığı sıcaklığa, temizlik çözeltisinin uygulandığı türbülans hızına ve temizlenen yüzeyin özelliklerine bağlıdır (Stewart ve Seiberling, 1996, Changani vd. 1997, Lelievre vd. 2001, Lelievre vd. 2002a, Lelievre vd. 2002b, Boulange-Petermann vd. 2004). Yerinde temizlik işlemlerinin etkinliği, yüzeye tutunan bakterileri veya biyofilmleri ortadan

kaldırabilmesi ile ilişkilidir (Austin ve Bergeron 1995, Faille vd. 2001, Dufour vd. 2004). Süt endüstrisinde kullanılan deterjan ve dezenfektanların seçimi, maddenin etkinliğine, güvenliğine, yıkanabilirliğine ve işleme ortamında bulunan sensörlere karşı aşındırıcı olup olmamasına bağlıdır (Marchand vd. 2012).

Kostik (alkali) yıkamanın rolü proteinlerin ve karbonhidratların uzaklaştırılmasıdır (Chisti 1999). Kostik yıkamanın etkinliğinin arttırılması, daha sonradan kullanılacak olan nitrik asit miktarını ve/veya dezenfektan kullanma ihtiyacını azaltabilir. Asit aşamasının rolü ise kostik yıkamaya maruz kaldıktan sonra yüzeylerde kalan mineral kalıntıların uzaklaştırılması ve ekipman yüzeylerinde kalan alkali ürünlerin uzaklaştırılmasıdır. Ayrıca, drenajı ve kurutmayı arttırarak, geriye kalan mikroorganizmaların gelişminin gecikmesine sebep olacak bakteriyostatik koşulların oluşumunu sağlar (White ve Rabe, 1970, Stewart ve Seiberling 1996). Süt endüstrisinde kullanılan en yaygın asit nitrik asittir ve kostik kimyasallar gibi, diğer asitler veya aktif maddeler içerebilen asit karışımları da formüle edilmiştir (Bremer vd. 2006).

Lequette ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, gıda endüstrisinde işleme hatlarında bulunan bakteri türlerinin biyofilmlerine karşı polisakkaridazların ve proteolitik enzimlerin temizleme etkinliği analiz edilmiştir. İki serin proteazın ve bir α-amilazın en etkili enzimler olduğu ortaya çıkmıştır. Proteolitik enzimler, polisakkaritlere kıyasla daha geniş bir bakteri türünün biyofilm giderimini desteklerken, daha spesifik olarak serin proteazlar *Bacillus* biyofilmlerinin giderilmesinde daha aktif olduğu gözlenmiş ve polisakkaridazların ise *Pseudomonas fluorescens* biyofilmlerinin giderilmesinde daha etkili olduğu bulunmuştur (Lequette vd. 2010). Enzimlerin, sürfaktanlar içeren bir tamponla çözdürülmesi ve içeriğinde şelatlayıcı maddelerin bulunmasının, *Bacillus* ve *P. fluorescens*'in biyofilmlerinin eliminasyonunda polisakkaridazların ve proteazların etkinliğini arttırdığı da gözlenmiştir (Lequette vd. 2010).

Süt tozu üretimi sırasında termofillerin sürekli olarak üretim bandında kullanılan ekipmanların yüzeylerine tutunduğu ve ayrıldığı gözlenmiştir. Aynı zamanda, süt kalıntılarının da sürekli olarak biriktiği bilinmektedir. Bu nedenle, tesisin her

çalıştırılma süreci sonunda, geride kalan süt kalıntılarında bakterilerin mevcudiyeti muhakkaktır. Hinton ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmalar, ekipmanların temizliğinde kullanılan kostik çözeltinin, süt kalıntılarında tutunan bakterilern çoğunu gideremediğini göstermektedir. Ayrıca süt kalıntıları, kostik çözelti tarafından uzaklaştırıldığı için, açığa çıkan yüzeyde bulunan bakteriler aktif hale gelir ve bir sonraki üretim çalışmasını tekrar kirletebilirler (Hinton vd. 2002).

Parkar vd. (2004) yaptığı çalışmalarda *A. flavithermus*'un paslanmaz çelik kuponlar üzerindeki biyofilmlerinin yerinde temizlik ajanları ile giderilmesi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre, kullanılan sanitasyon ajanlarının doğru konsantrasyonlarda kullanılması ve tavsiye edilen sıcaklıklarda uygulanması önemlidir. Kimyasal ajanlar, hücrelerin çoğunu giderdiğini fakat yüzeye tutunan tüm hücreleri gidermek konusunda başarısız olduğu gözlenmiştir (Parkar vd. 2004). Parkar ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada, biyofilm içerisindeki polisakkaritin dağıtılması ve alkali çözeltiler kullanılarak yapılan giderim sonucu, 60 dereceden daha fazla sıcaklıkta yapılması gerektiğini söylenmiştir. 50 derece alkali ve asit ile yapılan yıkamadan sonra bile ekzopolisakkarit kalıntıları gözlenmiştir. Ayrıca *A. flavithermus* üzerine yaptıkları giderim çalışmasında 30 dakika boyunca 75 derecede yapılan alkali ve asit yıkaması sonucunda %100 giderime ulaştıkları görülmektedir. Fakat bu giderim oranına alkali ve asit kombinasyonlarını ardı sıra kullanarak ve yüksek sıcaklıklarda uuzn süre maruz bırakarak ulaşırlarken, yapılan bu tez çalışmasında % 100 giderim oranlarına daha kısa sürede ulaşılmıştır. Kullanılan sanitasyon ajanlarından alkalen proteazın *A. flavithermus* DSM 2641^{T}'yi % 100 oranla, tripsinin ise *G. thermodenitrificans* DSM 465 ve *G. thermoglucosidans* B84a' yı olarak %100 olarak giderdiği, sodyum metaperiodatın ise *A. flavithermus* DSM 2641^{T} *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} % 100 olarak giderdiği, nisinin ise *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81'i %99 oranında potasyum monopersülfat ve sodyum tiyosülfat uygulamalarının ise sadece *G. thermodenitrificans* DSM 465^{T} %100'e varan oranlarla elimine ettiği görülmektedir. Tüm bu sanitasyon ajanları arasından sadece SDS ve TCA uygulamalarının dört farklı termofilik basilin biyofilmlerini yüksek oranda giderdiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında, statik koşullar altında üretilen biyofilmlerin enzimatik ve kimyasal ajanlar ile giderim sonuçlarına bakıldığında, kullanılan kimyasal ve enzimatik ajanların biyofilm

eliminasyonundaki başarısı tamamen, biyofilm gelişiminin sağlandığı inkübasyon süresine, biyofilmin geliştiği yüzeye, bakteri türüne, biyofilm matriks bileşenlerine ve biyofilm hücresi veya spor inhibisyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği söylenebilmektedir.

Tamamlanan bu tez çalışması ile;

- ✓ Ürettikleri sporlar ile, özellikle gıda endüstrisinde sahip oldukları karakter açısından sıklıkla tercih edilen 6 farklı yüzey arasındaki ilişkileri; sporların bu yüzeylere nasıl ve ne kadar tutundukları sorularına yanıt almak amacı ile yapılmış olan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.
- ✓ Gıda endüstrisinde, üretimde kullanılan ekipmanların temizliklerinde ve dezenfeksiyonlarında kullanılan, sporsidal özellikli kimyasal ajanların, literatürde yapılmış çalışmalara kıyasla bu kadar geniş bir şekilde ilk defa, terrmofilik basil sporları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sporsidal ajanların 4 farklı termofilik basilin sporları üzerindeki belirlenen giderim oranları hem mali açıdan hem de zaman açısından üretim bantlarının etkin temizlikleri için bir çözüm önerisi sunmaktadır.
- ✓ Özellikle süt ve süt endüstrisinde ısıya dayalı sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştiği üretim alanlarında sıklıkla izole edilen termofilik basillerin, hem biyofilmlerinin hem de sporlarının ısıl direnç profilleri, endüstride kullanılan sıcaklık aralıklarına uygun olarak belirlenen ısıl inaktivasyon aralıkları ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler, süt içerisindeki mikrobiyal yükün azaltılmasına yönelik ısıl modifikasyonlar için bir fikir vermekle beraber, bu ortamlarda termofilik basillerle neden bu kadar sık karşılaşıldığına cevap verir mahiyettedir.
- ✓ Son olarak, yerinde temizlik ajanları olarak kategorilendirilen, sıklıkla gıda endüstrisinde üretim bantlarının temizliğinde ve dezenfeksiyonunda kullanılan kimyasalların ve enzimatik ajanların, 4 farklı termofilik basilin biyofilmlerinin ve biyofilm içerisindeki sporlarının üzerindeki etkinlikleri çalışılarak, giderim oranları belirlenmiştir. Böylelikle, süt ve süt ürünlerinin üretiminin yapıldığı tesislerde kullanılan yerinde temizlik ajanları için daha yeni ve etkin öneriler

sunulmuş ve etkinliğin yanısıra süt ve süt ürünlerinin veya işlenilen ortamlardaki ekipmanların bozulmasına bağlı ekonomik kayıpların önüne geçebilecek maliyet ve zaman açısından tasarruf sağlayabileceği önemli bulgular elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

Al-Adham, I., Haddadin, R. and Collier, P. 2012. Types of microbicidal and microbistatic agents. Russell, Hugo and Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 5th Edition, 5-70.

Anema, S.G. 1998. Effect of milk concentration on heat-induced, pH-dependent dissociation of casein from micelles in reconstituted skim milk at temperatures between 20 and 120 C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(6), 2299-2305.

Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus reandaled by comparatiand analysis of small- subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology, 13(4), 202-206.

Austin, J.W., and Bergeron, G. 1995. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. Journal of Dairy Research, 62(3), 509-519.

Banner, M.J. 1995. The selection of disinfectants for use in food hygiene. In Handbook of biocide and preservatiand use (pp. 315-333).

Baldry, M.G.C. 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. Journal of Applied Bacteriology, 54, 417–423.

Bayles, K. W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. Nature Reviews Microbiology, 5(9), 721.

Beaman, T.C., Greenamyre, J.T., Corner, T.R., Pankratz, H.S. and Gerhardt, P., 1982. Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. Journal of bacteriology, 150(2), pp.870-877.

Beaman, T.C. and Gerhardt, P. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology, 52(6), 1242-1246.

Belduz, A.O., Dulger, S. and Demirbag, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(5), 1315-1320.

Beloian, A. 1990. Disinfectants, p. 133–146. *In* AOAC official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Va.

Beuchat, L.R., Pettigrew, C.A., Tremblay, M.E., Roselle, B.J. and Scouten, A.J. 2004. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and andgetable sanitizer to andgetatiand cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*. Journal of food protection, 67(8), 1702-1708.

Block, SS. 1991 Disinfection, sterilization, and preservation. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger Pubs.

Block, C. 2004. The effect of Perasafe and sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) against spores of *Clostridium difficile* and *Bacillus atrophaeus* on stainless steel and polyvinyl chloride surfaces. Journal of Hospital Infection, 57(2), 144-148.

Bloomfield, S.F. and Arthur, M. 1992. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine- T. Journal of applied bacteriology, 72(2), 166-172.

Boulange-Petermann, L., Jullien, C., Dubois, P. E., Benezech, T., and Faille, C. 2004. Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. Biofouling, 20(1), 25-33.

Borick, P.M. 1968. Chemical sterilizers (chemosterilizers). Advances in applied microbiology, 10, 291-312.

Bos, R., Van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesiand interactions–its mechanisms and methods for study. FEMS microbiology reviews, 23(2), 179-230.

Bouman, S., Daryl B. L., Frans M. D., and Daniel G. S. 1982. Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. Journal of Food Protection 45, no. 9, 806-812.

Bower, C.K., McGuire, J. and Daeschel, M.A. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. Trends in Food Science and Technology, 7(5), 152-157.

Boziaris, I.S. and Adams, M.R. 1999. Effect of chelators and nişin produced *in situ* on inhibition and inactivation of Gram negatiands, International Journal of Food Microbiology, 53, 105-13.

Bremer, P.J., Fillery, S. and McQuillan, A.J. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiandness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International journal of food microbiology, 106(3), 254-262.

Bremer, P., Seale, B., Flint, S., & Palmer, J. 2009. Biofilms in dairy processing. In Biofilms in the food and beverage industries. pp. 396-431.

Briggs, A., and Yazdany, S. 1974. Resistance of *Bacillus* spores to combined sporicidal treatments. Journal of Applied Bacteriology, 37(4), 623-631.

Burgess, S.A., Lindsay, D. and Flint, S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International journal of food microbiology, 144(2), 215-225.

Brooks, J.D. and Flint, S.H. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. International journal of food science and technology, 43(12), 2163-2176.

Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., and Ter Steeg, P.F. 2001. Effect of sporulation and recoandry medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. Journal of Applied Microbiology, 90(5), 761-770.

Chada, V.G., Sanstad, E.A., Wang, R. and Driks, A. 2003. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. Journal of bacteriology, 185(21), 6255-6261.

Changani, S. D., Belmar-Beiny, M. T., and Fryer, P. J. 1997. Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. Experimental Thermal and Fluid Science, 14(4), 392-406.

Chisti, Y. 1999. Modern systems of plant cleaning. Encyclopedia of food microbiology, 3, 1806-1815.

Crielly, E.M., Logan, N.A. and Anderton, A. 1994. Studies on *Bacillus* flora of milk and milk products. Journal of applied bacteriology, 77(3), 256-263.

Coates, D. 1996. Sporicidal activity of sodium dichloroisocyanurate, peroxygen and glutaraldehyde disinfectants against *Bacillus subtilis*. Journal of Hospital Infection, 32(4), 283-294.

Coates, D. 2001. An evaluation of the use of chlorine dioxide (Tristel One-Shot) in an automated washer/disinfector (Medivator) fitted with a chlorine dioxide generator for decontamination of flexible endoscopes. Journal of Hospital Infection, 48(1), 55-65.

Collier, P.J., Ramsey, A.J., Austin, P., and Gilbert, P. 1990. Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. Journal of Applied Bacteriology, 69(4), 569-577.

Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., and Logan, N.A. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus, G. stearothermophilus, G. jurassicus, G. toebii, G. thermodenitrificans and G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus sp*. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62(7), 1470-1485.

Cooney, P.H., and Freese, E. 1976. Commitment to sporulation in *Bacillus megateriu*m and uptake of specific compounds. Microbiology, 95(2), 381-390.

Costerton, J.W., Marrie, T.J., and Cheng, K.J. 1985. Phenomena of bacterial adhesion. In Bacterial adhesion (pp. 3-43). Springer US.

Cucksey, S., 2002. Rapid enumeration of thermophiles. Evaluation of the BacTrac 4100 micro-organism growth analyser in Pahiatua's milk powder factory. Master of Dairy Science and Technology Thesis, Massey Uniandrsity, Palmerston North.

Chen, S., Tang, Q., Zhang, X., Zhao, G., Hu, X., Liao, X., Chen F., Wu J. and Xiang, H. 2006. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. Food Microbiology, 23(5), 439-445.

D'àrcy, P.F. 1971. Inhibition and destruction of moulds and yeasts. In Inhibition and destruction of the microbial cell (pp. 613-686).

De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., and De Vos, P. 2004a. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. Applied and Environmental Microbiology, *70*(6), 3664-3672.

De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A., and De Vos, P. 2004b. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(3), 941-946.

De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., and DeVos, P. 2004c. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. Systematic and applied microbiology, 27(1), 50-60.

Dogan, Z., Weidendorfer, K., Muller-Merbach, M., Lembke, F. and Hinrichs, J. 2009. Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. LWT Food Science and Technology, 42(1); 81-86.

Donnellan, J.E., Nags, E.H., and Levinson, H.S. 1964. Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 87(2), 332-336.

Dufour, M., Simmonds, R. S., and Bremer, P. J. 2004) Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of "natural" antimicrobials against dairy biofilms. Journal of food protection, 67(7), 1438-1443.

Dumpler, J., and Kulozik, U. 2015. Heat stability of concentrated skim milk as a function of heating time and temperature on a laboratory scale–Improved methodology and kinetic relationship. International Dairy Journal, 49, 111-117.

Dunne, W.M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clinical microbiology reviews, 15(2), 155-166.

Dye, M. and Mead, G.C. 1972. The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. International Journal of Food Science and Technology, 7(2), 173-181.

Elliott, A.J., Datta, N., Amenu, B. AND Deeth, H.C. 2005. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. Journal of Dairy Research, 72(4), 442-446.

Etoa, F.X. and Michiels, L. 1988. Heat- induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. Letters in Applied Microbiology, 6(3), 43-45.

Faille, C., Lebret, V., Gavini, F. and Maingonnat, J.F. 1997. Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. Journal of Food Protection, 60(5), 544-547.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C. and Benezech, T. 2002. Adhesion of *Bacillus spores* and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. Canadian journal of microbiology, 48(8), 728-738.

Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8(9), 623-633.

Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plantdescription, current concerns and methods of control. Biofouling, 11(1), 81-97.

Flint, S. H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001a. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. Journal of applied microbiology, 90(2), 151-157.

Flint, S.H., Ward, L.J. and Walker, K.M. 2001b. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region. Systematic and Applied Microbiology, 24(4), 539-548.

Florjanic, M. and Kristl, J. 2011. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. International journal of pharmaceutics, 405(1-2), 16-22.

Foster, J.W. and Heiligman, F. 1949. Biochemical factors influencing sporulation in a strain of *Bacillus cereus*. Journal of bacteriology, 57(6), 639.

Fraise, A.P., Lambert, P.A. and Maillard, J.Y. (Eds.). 2008. Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. John Wiley and Sons.

Galopin, E., Piret, G., Szunerits, S., Lequette, Y., Faille, C. and Boukherroub, R. (2009). Selectiand adhesion of *Bacillus cereus* spores on heterogeneously wetted silicon nanowires. Langmuir, 26(5), 3479-3484.

Garny, K., Harald H. and Thomas R. N. 2008. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. Bioprocess and biosystems engineering 31, no. 6, 619-629.

Gerhardt, P. and Ribi, E. 1964. Ultrastructure of the exosporium enandloping spores of *Bacillus cereus*. Journal of bacteriology, 88(6), 1774-1789.

Gómez-Jódar, I., Ros-Chumillas, M. and Palop, A. (2016). Effect of heating rate on highly heat-resistant spore-forming microorganisms. Food Science and Technology International, 22(2), 164-172.

Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. and Yokota, A. 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (= NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus sp*. nov. and *Brevibacillus limnophilus sp.* nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 54(2), 419-427.

Gorman, S.P., Jones, D.S. and Loftus, A.M. 1987. The sporicidal activity and inactivation of chlorhexidine gluconate in aqueous and alcoholic solution. Journal of applied bacteriology, 63(2), 183-188.

Havea, P., Singh, H. and Creamer, L.K. 2002. Heat-induced aggregation of whey proteins: comparison of cheese WPC with acid WPC and relevance of mineral composition. Journal of agricultural and food chemistry, 50(16), 4674-4681.

Havea, P., Watkinson, P. and Kuhn-Sherlock, B. 2009. Heat-induced whey protein gels: Protein− protein interactions and functional properties. Journal of agricultural and food chemistry, 57(4), 1506-1512.

Heinen, W., Lauwers, A.M. and Mulders, J.W.M. 1982. *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultatiand thermophile. Antonie van Leeuwenhoek, 48(3), 265-272.

Heinzel, M. 1988. The phenomena of resistance to disinfectants and preservatives. Industrial biocides, 22, pp.52-67.

Henriques, A.O. and Moran Jr, C.P. 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. Methods, 20(1), 95-110.

Heyrman, J., Balcaen, A.N., Rodriguez-Diaz, M., Logan, N.A., Swings, J. and De Vos, P. 2003. *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53(2), 459-463.

Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan N. A., Ali R. and Berkeley, R. C. W. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjectiand synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae subsp. larvae* and *P. larvae subsp. pulvifaciens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 46(1), 270-279.

Heyndrickx, M., Lebbe, L., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Nazli S., Ali N. and Berkeley, R.C.W. 1997. A polyphasic reassessment of the genus *Aneurinibacillus*, reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb, nov., and emended descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47(3), 808-817.

Herman, L., Heyndrickx, M. and Waes, G. 1998. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitiand element sequence based PCR. Letters in applied microbiology, 26(3), 183-188.

Hill, B.M. and Smythe, B.W. 1994. Progress in understanding the behaviour of thermophilic bacteria during milk powder manufacture. Milk powders for the future II, 19-26.

Hill, B.M. 2004. Thermophilic spores: UHT and retort processing of recombined milks. In Proceedings of the 4th International Symposium on Recombined Milk and Milk Products. US Dairy Export Council, Cancun, Mexico (pp. 184-193).

Hintze, P.E. and Nicholson, W.L. 2010. Single-spore elemental analyses indicate that dipicolinic acid-deficient *Bacillus subtilis* spores fail to accumulate calcium. Archiands of microbiology, 192(6), 493-497.

Hinrichs, J. 2000. UHT processed milk concentrates. Le Lait, 80(1), 15-23.

Hinton, A.R., Trinh, K.T., Brooks, J.D. and Manderson, G.J. 2002. Thermophile survival in milk fouling and on stainless steel during cleaning. Food and bioproducts processing, 80(4), 299-304.

Holt, C. 1985. The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry. In Developments in dairy chemistry 3 (pp. 143-181). Springer, Dordrecht.

Hugo, W.B. and Russell, A.D., Types and antimicrobial agents. In Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. (Eds.). 1982. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 8-106.

Ingram, L.O. and Buttke, T.M. 1984 Effects of alcohols on micro-organisms. Advances in Microbial Physiology, 25, 253–300.

Jefferson, K.K. 2004. What driands bacteria to produce a biofilm? FEMS microbiology letters, 236(2), 163-173.

Johnstone, K. 1994. The trigger mechanism of spore germination: current concepts. Journal of Applied Bacteriology, 76, pp.17S-24S.

Jones, M.N. and Turnbull, P.C.B. 1996. Disinfection against spores of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med Bull, 87, 74-78.

Karaca, B. 2018. Farklı Çevresel Koşulların Süt Ürünleri Endüstrisinde Sorun Teşkil Eden *Geobacillus* and *Anoxybacillus* Biyofilmleri Üzerine Olan Etkilerinin ve Biyogiderim Mekanizmalarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Kaul, A. and Singh, R.S. 1982. Production of stable *Bacillus stearothermophilus* spores. Journal of Food Protection, 45(9), 795-796.

Kilic, T., Karaca, B., Ozel, B.P., Ozcan, B., Cokmus, C. and Coleri Cihan, A. 2017. Biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures of thermophilic *Aeribacillus pallidus* E334 biofilms. Biofouling, 33(4), 352-367.

Kılıç, T. 2016. Yüksek Miktarda Biyofilm Oluşturan Termofilik Basillerin Çeşitli Yüzeylerdeki Biyofilm Yapılarının Analizi ve Biyofilmin Giderimi ile Biyokorozyoun Önlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Knight, G.C., Nicol, R.S. and McMeekin, T.A., 2004. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of Streptococcus thermophilus in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. International journal of food microbiology, 93(3), pp.305-318.

Knott, A. G., Dancer, B. N., Hann, A. C., and Russell, A. D. 1997. Non- variable sources of pure water and the germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. Journal of applied microbiology, 82(2), 267-272.

Kulikovsky, A., Pankratz, H.S. and Sadoff, H.L. 1975. Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants. Journal of Applied Bacteriology, 38(1), 39-46.

Langeveld, L.P.M., Klijn, W. and van der Waals, C.B., 1990. Bacterial growth in evaporators for milk and whey. *Voedingsmiddelentechnologie (Netherlands)*.

Lee, S.W. and Sim, S.J. 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat-shocked during sporulation. Journal of microbiology and biotechnology, 16(4), 633-636.

LeDeaux, J.R., and Grossman, A.D. 1995. Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 177(1), 166-175.

Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., and Faille, C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. Biofouling, 26(4), 421-431.

Lelievre, C., Faille, C., and Benezech, T. (2001). Removal kinetics of Bacillus cereus spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. Journal of food process engineering, 24(6), 359-379.

Lelievre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., and Bénézech, T. 2002a. Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. Chemical Engineering Science, 57(8), 1287-1297.

Lelievre, C., Antonini, G., Faille, C., and Bénézech, T. 2002b. Cleaning-in-Place: modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by Bacillus spores assuming a process combining removal and deposition. Food and Bioproducts Processing, 80(4), 305-311.

Leuschner, R.G. and Lillford, P.J. 2001. Inandstigation of bacterial spore structure by high resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and transmission electron microscopy. International journal of food microbiology, 63(1-2), 35-50.

Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D., and Seldin, L. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *59*(8), 2114-2121.

Logan, N.A. and De Vos, P.D. 2015. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

Loshon, M. 1988. The phenomena of resistance to disinfectants and preservatiands, in Industrial Biocides, vol. 22, Critical Reports on Applied Chemistry (ed. K.R. Payne), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 52–67.

Loshon, C.A., Genest, P.C., Setlow, B. and Setlow, P. 1999. Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid- soluble spore proteins of the αααααα/βββββββ- type protect spores against this DNA damage. Journal of Applied Microbiology, 87(1), 8-14.

Lucchini, J.J., Corre, J. and Cremieux, A. 1990. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. Research in Microbiology, 141(4), 499-510.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock biology of microorganisms (Vol. 11), 87-90, Upper Saddle Riandr, NJ: prentice hall.

Maillard, J.Y. 2002 Bacterial target sites for biocide action. Journal of Applied Microbiology, 92, 16S–27S.

Maillard, J.Y. 2011. Innate resistance to sporicides and potential failure to decontaminate. Journal of Hospital Infection, 77(3), 204-209.

Majcher, M.R., Bernard, K.A. and Sattar, S.A. 2008. Identification by quantitatiand carrier test of surrogate spore-forming bacteria to assess sporicidal chemicals for use against *Bacillus anthracis*. Applied and environmental microbiology, 74(3), 676-681.

Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T.J. and Berzano, M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. Environmental microbiology, 4(10), 595-602.

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensiand Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2), 133-147.

Mashall, K. 1994. Microbial adhesion in biotechnological processes. curr. Opin. biotec, *5*, 296-301.

Matz, L.L., Beaman, T.C. and Gerhardt, P. 1970. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. Journal of bacteriology, 101(1), 196-201.

McDonnell, G. and Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical Microbiology Reviews, 12, 147–179.

McDonnell, G.E. 2007. Chemical disinfection, in Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. ASM Press, Washington, DC, pp. 79–148.

McGuiggan, J.T., McCleery, D.R., Hannan, A. and Gilmour, A. 2002. Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic Bacillus spores. International journal of dairy technology, 55(2), 100-107.

Mittelman, M. W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. Journal of dairy science, 81(10), 2760-2764.

Morton, L.H.G. and Gaylarde, C.C. 2001. The role of microbial slimes in biodeterioration. Culture, 22, 1-8.

Morgenroth, E. 2003. Detachment: an often-overlooked phenomenon in biofilm research and modeling. Biofilms in wastewater treatment. 246-290.

Mostert, J.F., Luck, H. and Husmann, R.A. 1979. Isolation identification and practical properties of *Bacillus* sp. from ultra high temperature and sterilized milk. South African Journal of Dairy Technology, 11; 125-132.

Muir, D.D., Griffiths, M.W., Phillips, J.D., Sweetsur, A.W.M. and West, I.G. 1986. Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some

other properties of low- heat and high- heat dried milk. International Journal of Dairy Technology, 39(4), 115-118.

Munton, T.J. and Russell, A.D., 1970. Effect of glutaraldehyde on protoplasts of *Bacillus megaterium*. Microbiology, 63(3), pp.367-370.

Murphy, P.M., Lynch, D. and Kelly, P.M. 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. International Journal of Dairy Technology, 52(2), 45-50.

Narayan, M., Welker, E., Wedemeyer, W.J. and Scheraga, H.A. 2000. Oxidatiand folding of proteins. Accounts of chemical research, 33(11), 805-812.

Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltaraus, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V, Osipov G.A., Belyaev S.S. and Ivanov, M.V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis sp*. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 51(2), 433-446.

Nichols, W.W. 1989. Susceptibility of biofilms to toxic compounds (pp. 321-331). Wiley-Interscience.

Nishihara, T. and Freese, E. 1975. Motility of *Bacillus subtilis* during growth and sporulation. Journal of bacteriology, 123(1), 366-371.

Nold, S.C., Kopczynski, E.D. and Ward, D.M. 1996. Cultivation of aerobic chemoorganotrophic proteobacteria and gram-positiand bacteria from a hot spring microbial mat. Applied and environmental microbiology, 62(11), 3917-3921.

Oomes, S.J.C.M., Jonker, M.J., Wittink, F.R.A., Hehenkamp, J.O., Breit, T.M. and Brul, S. 2009. The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *Bacillus subtilis* cells. International journal of food microbiology, 133(3), 234-242.

Palop, A., Manas, P. and Condon, S. 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. Journal of Food Safety, 19(1), 57-72.

Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S. and Brooks, J.D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. Journal of Applied Microbiology, 90(6), 901-908.

Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli-potential consequences for cleaning, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30, 553-60.

Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D., 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Applied Microbiology, 96(1), pp.110-116.

Perez, J., Springthorpe, V.S. and Sattar, S.A. 2005. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control. American Journal of İnfection Control, 33(6), 320-325.

Peng, J.S., Tsai, W.C. and Chou, C.C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. International Journal of Food Microbiology, 65(1-2), 105-111.

Pikuta, E., Lysenko, A.M., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G.A. and Laurinavichius, K. 2000. *Anoxybacillus pushcinensis* gen. nov., sp nov., a noandl anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure,and description of *Anoxybacillus flavothermus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 2109–2117.

Pikuta, E., Cleland, D. and Tang, J. 2003. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1(T): emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1561–1562.

Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y.S. and Kweon, J.H. 2010. 2 (5H)-Furanone: a prospectiand strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. Brazilian Journal of Microbiology, 41(1), 227-234.

Radchenkova, N., Tomova, A. and Kambourova, M. 2011. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 25(sup1), 77-79.

Rainey, F.A., Fritze, D. and Stackebrandt, E. 1994. The phylogenetic diandrsity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as reandaled by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters, 115(2-3), 205-211.

Refstrup, E. Heat treatment of milk prior to evaporation and drying. In 25. International Dairy Congress, 2: Dairy Science and Technology, Aarhus (Denmark), 21-24 Sep 1998. IDF, 1999.

Refstrup, E., 2000. Evaporation and drying technology developments. International Journal of Dairy Technology, 53(4), pp.163-167.

Ren, P.G. and Zhou, P.J. 2005. *Salinibacillus aidingensis* gen. nov., sp. nov. and *Salinibacillus kushneri* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xin-Jiang, China. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55(2), 949-953.

Reybrouck, G. 1998. The testing of disinfectants. International biodeterioration & biodegradation, 41(3-4), 269-272.

Rogers, J.V., Choi, Y.W., Richter, W.R., Rudnicki, D.C., Joseph, D.W., Sabourin, C.L.K., Taylor M.N. and Chang, J.C.S. 2007. Formaldehyde gas inactivation of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surface materials. Journal of applied microbiology, 103(4), 1104-1112.

Rice, A.R., Hamilton, M.A. and Camper, A.K. 2000. Apparent surface associated lag time in growth of primary biofilm cells. Microbial Ecology, 40(1), 8-15.

Rubbo, S.D., Gardner, J.F. and Webb, R.L. 1967. Biocidal activities of glutaraldehyde and related compounds. Journal of Applied Bacteriology, 30(1), 78-87.

Rudolf, A.S. and Levine, M. 1941. Iowa Engineering and Experimental Station bulletin 150. Iowa Engineering and Experimental Station, Iowa.

Romney, A.J.D. 1990. CIP: cleaning in place. ed. 2. Society of Dairy Technology.

Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A. and Morgan, H.W. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. International journal of food microbiology, 85(1-2), 45-61.

Rönner, U., Husmark, U. and Henriksson, A., 1990. Adhesion of Bacillus spores in relation to hydrophobicity. Journal of applied bacteriology, 69(4), pp.550-556.

Rossmoore, H.W. 1995. Handbook of Biocide and Preservatiand Use, Chapman and Hall.

Russell, A.D. and Hopwood, D., 1976. The biological uses and importance of glutaraldehyde. Prog Med Chem, 13, pp.271-301.

Russell, A.D. 1982. The destruction of bacterial spores, p. 169–231. Academic Press, Ltd., London, England.

Russell, A.D. 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. Clinical microbiology reviews, 3(2), 99-119.

Russell, A.D. 1994. Glutaraldehyde: current status and uses. Infection Control and Hospital Epidemiology, 15(11), 724-733.

Russell, A.D. and Day, M.J. 1996. Antibiotic and biocide resistance inn bacteria. Microbios, 85(342), 45-65.

Russell, A.D. 1998. Assesssment of sporicidal efficacy. International biodeterioration and biodegradation, 41(3-4), 281-287.

Russell, A.D. 2003. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52(5), 750-763.

Sacks, L.E. and Alderton, G. 1961. Behavior of bacterial spores in aqueous polymer two-phase systems. Journal of bacteriology, 82(3), 331-341.

Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., and He, G. 2016. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. International journal of food microbiology, 238, 193-201.

Sagripanti, J.L. and Bonifacino, A. 1996a. Comparatiand sporicidal effect of liquid chemical germicides on three medical devices contaminated with spores of *Bacillus subtilis*. American journal of infection control, 24(5), 364-371.

Sagripanti, J.L. and Bonifacino, A. 1996b. Comparatiand sporicidal effects of liquid chemical agents. Applied and environmental microbiology, 62(2), 545-551.

Sauer, K., Rickard, A.H. and Davies, D.G., 2007. Biofilms and biocomplexity. Microbe-American Society for Microbiology, *2*(7), p.347.

Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J. and Bremer, P.J. 2008. Recoandry of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. Applied and environmental microbiology, 74(3), 731-737.

Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J.P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 54(3), 704-711.

Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2005. Incidence and diandrsity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. Applied and Environmental Microbiology, 71(3), 1480-1494.

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S. and Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat- resistant spore formers in milk. Journal of Applied Microbiology, 101(3), 542-555.

Schwarzenbach, R.R. and Hill, B.M. 1999. Do bacterial spores in milk powders surviand UHT processing. Milk Powders for the Future 4, Palmerston North, 30 June−2 July 1999. Dairy Institute, 53-58, New Zealand.

Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. International journal of dairy technology, 60(2), 109-117.

Setlow, P. 2006. Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of applied microbiology, 101(3), 514-525.

Setlow, P. 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. Trends in microbiology, 15(4), 172-180.

Setlow, P. 2012. Resistance of bacterial spores to chemical agents. Russell, Hugo and Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 5th Edition, 121-130

Setlow, P. and Johnson, E.A. 2013. Spores and their significance. In *Food microbiology* (pp. 45-79). American Society of Microbiology.

Shaker, L.A., Russell, A.D., and Furr, J. R. 1986. Aspects of the action of chlorhexidine on bacterial spores. International journal of pharmaceutics, 34(1-2), 51-56.

Shaker, L. A., Furr, J. R. and Russell, A.D. 1988a. Mechanism of resistance of *Bacillus subtilis* spores to chlorhexidine. Journal of applied bacteriology, 64(6), 531-539.

Shaker, L.A., Dancer, B.N., Russell, A.D. and Furr, J.R. 1988b. Emergence and deandlopment of chlorhexidine resistance during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. FEMS microbiology letters, 51(1), 73-76.

Sharp, R.J., Riley, P.W. and White, D. 1992. Heterotrophic thermophilic bacilli. Thermophilic bacteria, 19-50.

Stackebrandt, E., Ludwıg, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGıll, T.J., Fox, G.E., Woese C.R., Schubert W. and Schleıfer, K.H. 1987. Comparatiand 16S rRNA

oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatiands. Microbiology, 133(9), 2523-2529.

Stalheim, T. and Granum, P.E. 2001. Characterization of spore appendages from *Bacillus cereus* strains. Journal of applied microbiology, 91(5), 839-845.

Stewart, P.S., McFeters, G.A. and Huang, C.T., 2000. Biofilm control by antimicrobial agents. In Biofilms II: Process analysis and applications. pp. 373-405.

Stewart, J.C. and Seiberling, D.A., 1996. Clean in place. Chemical engineering, 103(1), p.72.

Stickler, D.J. 1997. Chemical and physical methods of biofilm control. In Biofilms: Community Interactions and Control (pp. 215-225). BioLine.

Stoeckel, M., Lücking, G., Ehling-Schulz, M., Atamer, Z. and Hinrichs, J. 2016. Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. Dairy Science & Technology, 96(4), 569-577.

Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix–an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology, 9(5), 222-227.

Suzuki, Y., Kishigami, T. and Abe, S. 1976. Production of extracellular alphaglucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology, 31(6); 807-812.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Yano, H. and Komagata, K. 1996. Differentiation of species in the *Bacillus brevis* group and the *Bacillus aneurinolyticus* group based on the electrophoretic whole-cell protein pattern. Antonie Van Leeuwenhoek, 70(1), 31-39.

Sykes, G. 1970. (Symposium on Bacterial Spores: Paper XII) The Sporicidal Properties of Chemical Disinfectants. Journal of Applied Bacteriology, 33(1), 147-156.

Sykes G. 1990. The sporicidal properties of chemical disinfectants. J Appl Bacteriol, 33,147- 156.

Szabo, J.G., Adcock, N.J. and Rice, E.W. 2014. Disinfection of *Bacillus* spores with acidified nitrite. Chemosphere, 113, 171-174.

Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L. and Yaron, S. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. FEMS microbiology letters, 267(2), 200-206.

Tai, S.K., Lin, H. P. P., Kuo, J. and Liu, J. K. 2004. Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. Extremophiles, 8(5), 345-349.

Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shimamura, S. and Takaki, Y. 2004. Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. Extremophiles, 8(5), 351-356.

Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P. and Lindsay, D. 2014. Biofilm− An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? International Dairy Journal, 34(1), 32-40.

Teh K.H., Flint S., Brooks J. and Knight, G. 2015. Biofilms in the dairy technology. Wiley, New York, pp 65–98.

Telgmann, U., Horn, H. and Morgenroth, E., 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. Water Research, 38(17), pp.3671-3684.

Thomas, S. and Russell, A.D., 1974. Temperature-induced changes in the sporicidal activity and chemical properties of glutaraldehyde. Applied microbiology, 28(3), pp.331-335.

Thomas, S. and Russell, A.D., 1975. Sensitivity and resistance to glutaraldehyde of the hydrogen and calcium forms of Bacillus pumilus spores. Journal of Applied Bacteriology, 38(3), pp.315-317.

Thurman, R.B. and Gerba, C.P. 1988. Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. Advances in Applied Microbiology, 33, 75–105.

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A.J.B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiological Reviews, 54, 75–87

Van der Mei, H. C., Bos, R. and Busscher, H. J. 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 11(4), 213-221.

Andrt, M, Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. and Schué, F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). Pure Appl. Chem. 84:377–410

Vidal, D., Desor, F. and Richard, M. 1996. Comparatiand study of the sensitivity to aldehyde disinfectants of *Bacillus anthracis* spores and other *Bacillus* species. Travaux Scientifiques des Chercheurs du Service Santé des Armées;17: 45-46.

Vinter, V. 1969. Physiology and biochemistry of sporulation. The bacterial spore, 1, 73-123.

Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and molecular biology reviews, 65(1), 1-43.

Yildiz, F. and Westhoff, D.C. 1989. Sporulation and thermal resistance of Bacillus stearothermophilus spores in milk. Food Microbiology, 6(4), 245-250.

Yuan, D. D., Liu, G. C., Ren, D. Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C. P., and Zhang, L. B. 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. Food Control, 25(2), 752-757.

Yoon, J.H., Oh, T.K. and Park, Y.H. 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariaz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 54(6), 2163-2167.

Young, S.B. and Setlow, P. 2003. Mechanisms of killing of Bacillus subtilis spores by hypochlorite and chlorine dioxide. Journal of Applied Microbiology, 95(1), 54-67.

Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A. and Price, R.L. 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. Journal of Microbiological methods, 58(1), 23-30.

Wainø, M., Tindall, B.J., Schumann, P. and Ingvorsen, K. 1999. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49(2), 821-831.

Warriner, K. and Waites, W.M. 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose: ribose. Letters in applied microbiology, 29(2), 97-102.

Wedel, C., Wunsch, A., Wenning, M., Dettling, A., Kayser, K.H., Lehner, W.D. and Hinrichs, J. 2018. Thermal treatment of skim milk concentrates in a noandl shear-heating device: Reduction of thermophilic spores and physical properties. Food Research International, 107, 19-26.

Wells-Bennik, M.H., Janssen, P.W., Klaus, V., Yang, C., Zwietering, M.H., and den Besten, H.M. 2018. Heat resistance of spores of 18 strains of Geobacillus stearothermophilus and impact of culturing conditions. International Journal of Food Microbiology.

White, J.C., and Rabe, G.O. 1970. Evaluating the use of nitric acid as a detergent in dairy cleaned-in-place systems. Journal of Milk and Food Technology, 33(1), 25-28.

Wiencek, K.M., Klapes, N.A., and Foegeding, P.M. 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. Applied and environmental microbiology, 56(9), 2600-2605.

Williams, N.D. and Russell, A.D. 1993. Revival of biocide-treated spores of *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 75, 69–75.

Witthuhn, M., Luecking, G., Atamer, Z., Ehling-Schulz, M. and Hinrichs, J. 2011. Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. International journal of dairy technology, 64(4), 486-493.

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G. and Poralla, K. 1992, Comparatiand sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov, Int J Syst Bacteriol, 42, 263–26.

Wirtanen, G., Husmark, U. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. Journal of Food Protection, 59(7), 727-733.

Wullt, M., Odenholt, I.. and Walder, M. 2003. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. Infection Control and Hospital Epidemiology, 24(10), 765-768.

Zarilla, K.A. and Perry, J.J. 1987. *Bacillus thermokovorans, sp*. nov., a Species of Obligately Thermophilic Hydrocarbon Utilizing Endospore-forming Bacteria. Systematic and applied Microbiology, 9(3), 258-264.

Zottola, E.A. and Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry—should they be a concern? International journal of food microbiology, 23(2), 125-148.

Zhang, X., Bishop, P.L. and Kinkle, B.K. 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. Water science and technology, 39(7), 211-218.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Büşra KARAKAYA

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 20 Ocak 1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Çağrı Koleji (2006)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2016- Ocak 2019)

Uluslararası Kongre Sunumları

Effect of Milk Fat Concentration and Abiotic Surfaces on Biofilm Formation of *Geobacillus thermodenitrificans*, Poster Sunumu, Biofilms 8, Aarhus Danimarka, 27-29 Mayıs 2018

Extracellular DNA in *Geobacillus* and *Anoxybacillus* Biofilms, Poster Sunumu, Biofilms 8 Aarhus Danimarka, 27-29 Mayıs 2018

Antibiofilm effects of three macrofungi (*Morchella angusticeps*, *Trametes versicolor*, *Lactarious delicious*) on *Enterococcus faecalis*. Poster sunumu, I. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi "Doğal ve Sağlıklı Yaşam" Konya, Türkiye, 10-12 Mayıs 2017

Evaluation of *Pleurotus ostreatus* Extracts for its Potential Antibiofilm Activity. Poster Sunumu, I. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi "Doğal ve Sağlıklı Yaşam", Konya Türkiye, 10-12 Mayıs 2017

Aldığı Burslar

116Z422 kodlu “Süt Endüstirisinde, Termofilik Basillerin Biyofilm Oluşumlarının ve Biyofilm-Spor Giderimlerinin Mikrobiyolojik, Mikroskobik ve Moleküler Biyolojik Tekniklerle İncelenmesi” başlıklı 1001 projesinde bursiyer (2017-2020).