T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

GIDA İŞLETMELERİNDE PATOJENLER TARAFINDAN OLUŞTURULMUŞ BİYOFİLMLER ÜZERİNE NANOTEKNOLOJİK DEZENFEKTANLARIN ETKİSİ

NURAY KEMENT

DANIŞMAN

PROF. DR. TOLGA KAHRAMAN

II. DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET KOLUMAN

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ PROGRAMI

İSTANBUL-2021

İTHAF

Kıymetli annem Zeynep ve babam Mustafa KEMENT'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince fikirleri, bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla yaptıklarıma yön veren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu tezi bitirebilmem de çok büyük katkı sahibi sayın çok kıymetli danışman hocalarım Prof. Dr. Ahmet KOLUMAN ve Prof. Dr. Tolga KARAMAN'a gönülden sonsuz teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veterinerlik Bölümü öğretim üyesi Doç Dr. Karlo MURATOĞLU ve Arş. Gör. Alp Emre YILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TDK-2019-34310) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen, yüreklendiren ve bugünlere gelmemde büyük emeği olan annem Zeynep KEMENT'e, cesaretimi borçlu olduğum babam Mustafa KEMENT'e, her zaman yanımda oldukları için kardeşlerim Okay ve Önder Oktay KEMENT'e ve özellikle sabrı ve desteği için değerli eşim Merih Bahri GÜRLÜK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Nuray KEMENT

İSTANBUL, Aralık 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1 GİRİŞ VE AMAÇ 1
2 GENEL BİLGİLER 5
2.1 Biyofilmlerin Tanımı ve Oluşum Sebepleri 5
2.2 Biofilm Oluşumu Aşamaları 8
2.2.1 Bakterilerin Yüzeye Tutunması ve Biyofilm Oluşumu 11
2.2.2 Bakteri Hücrelerinin EPS Üreterek Yüzeye Bağlanması 13
2.2.3 Koloni oluşumu 14
2.2.4 Olgun Biyofilm Oluşumu 17
2.2.5 Olgun Biyofilm Hücrelerinin Göçü (Koparak Ayrılması) 19
2.3 Biyofilm Matris Bileşenlerini Oluşturan EPS 22
2.3.1 Polisakkaritler 23
2.3.2 Proteinler 25
2.3.3 Lipidler ve Sürfektanlar 26
2.3.4 Su 28
2.3.5 Hücre dışı DNA (eDNA) 29
3 GEREÇ VE YÖNTEM 71
3.1 GEREÇLER 71
3.1.1 Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar 71
3.2 YÖNTEM 74
3.2.1 Biyofilmi oluşturulacak suşlarının gücünün belirlenmesi 74

3.2.2 Bakteri zenginleştirme 75
3.2.3 Bakteri sayımı 75
3.2.4 Biyofilm oluşturma 76
3.2.4.1 *Salmonella* Enteridis biyofilmi oluşturulması 76
3.2.4.2 *E.coli O157* biyofilmi oluşturulması 76
3.2.4.3 *L.monocytogenes* biyofilmi oluşturulması 76
3.2.5 Dezenfektan hammaddelerinin seçimi ve etkinliklerinin belirlenmesi 76
3.2.6 Dezenfektan tasarımı 77
3.2.7 Dezenfektanın uygulanması ve güç tayini 77
3.2.8 Biyofilm görüntüleme 78
3.2.9 Dezenfektanların restaurantlarda uygulanması 78
4 BULGULAR 80
4.1 Dezenfektan ham maddelerinin etkinliklerin değerlendirilmesi 80
4.1.1 *Salmonella* Enteritidis üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini 81
4.1.2 *Listeria monocytogenes* üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini 85
4.1.3 *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini 88
4.2 Endüstriyel kullanıma uygun olarak hazırlanan ve gümüş nanopartikül içeren dezenfektanları 92
4.2.1 *Salmonella* Enteritidis biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri 93
4.2.2 *L. monocytogenes* biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri 94
4.2.3 *E. coli* O157 biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri 95
4.3 Biyofilmin morfolojik incelemesi 96
4.4 Oluşturulan gümüş nanopartikül içeren dezenfektan karışımlarının restoranlarda denemeleri 101
5 TARTIŞMA 103
KAYNAKLAR 124
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 161
ÖZGEÇMİŞ 162

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Hücre tutunması ve biyofilm oluşumunda önemli değişkenler (Donlan 2002) 13
Tablo 2-2. Gıda işletmelerinde biyofilm oluşturan bakteriler 33
Tablo 2-3. Gıda üretim alanlarındaki yüzey materyallerinin biyofilm oluşumunu destekleme oranı (Meyer 2003) 42
Tablo 2-4. Biyositlerin etki şekilleri 56
Tablo 3-1. Biyofilm giderimi için oluşturulan gümüş nanopartikül (Ag NP) içeren dezenfektan karışımları 77
Tablo 3-2 Restoran mutfaklarından numune alınan alanlar 79
Tablo 4-1. Dezenfektan karışımları formülasyonları tablosu 92
Tablo 4-2 Restoran mutfaklarında sık kullanılan yüzeylerde dezenfektan karışımının etkinliği 102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1.1. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezine (CDC) 1998-2004 döneminde bildirilmiş gıda kaynaklı hastalık salgınlarının kaynakları (Jones ve Angulo 2016) 1
Şekil 2-1.1. Biyofilmin 3 boyutlu görüntüsü (Çiftçi 2005) 7
Şekil 2-2.Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumunu, yapısını ve işlevselliğini etkileten faktörler (Whitehead ve Verran 2015 9
Şekil 2-3. . Biyofilm oluşum aşamaları modeli (Otto 2013). 10
Şekil 2-4 Endüstriyel su sisteminde çelik yüzeyde 8 haftalık biyofilm (Donlan 2002). 36
Şekil 2-5. Gıdalarda anti-biyofilm stratejileri (Zhao ve ark. 2017) 38
Şekil 2-6. Biyofilmleri inceleme ve değerlendirme yöntemleri (Azeredo ve ark. 2016) 50
Şekil 3-1 Çalışma akış planı 74
Şekil 4-1. S. Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 1 82
Şekil 4-2. S. Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 2 83
Şekil 4-3.S. Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 3 83
Şekil 4-4. S. Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 4 84
Şekil 4-5. S. Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 5 84
Şekil 4-6. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 1 .. 86
Şekil 4-7. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 2 .. 86
Şekil 4-8. *L. monocytogene*s üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 3 .. 87
Şekil 4-9. *L. monocytogene*s üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 4 .. 87
Şekil 4-10. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 5 88
Şekil 4-11. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 1..... 89
Şekil 4-12. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 2..... 90
Şekil 4-13. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 3..... 90
Şekil 4-14. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 4..... 91
Şekil 4-15. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 5..... 91
Şekil 4-16. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının S. Enteritidis biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma..... 93
Şekil 4-17. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının *L. monocytogenes* biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma..... 94

Şekil 4-18. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının E. coli O157 biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma 95
Şekil 4-19. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması öncesi biyofilmin SEM görüntüleri 97
Şekil 4-20. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilmin ve yüzeyin SEM görüntüleri 98
Şekil 4-21. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilmin SEM görüntüsü 99
Şekil 4-22. Biyofilmdeki *E. coli 0157* bakterisinin bölünmesinin engellenmesinin SEM görüntüsü 99
Şekil 4-23. Dezenfektan içindeki gümüş nanopartikülün görüntüsü 100
Şekil 4-24. PCA agarda görülen toplam mezofilik aerobik bakteri koloni sayılarının yüzey alanına oranı ($log/_{CFU/cm^2}$) ve koloni sayımının yapıldığı petri görüntüleri 101

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler Dizini

%	Yüzde
^{o} C	Santigrat Derece
Ag	Gümüş
Ca^{+2}	Kalsiyum
CFU	Koloni Oluşturan Birim
Cm^2	Santimetrekare
G	Gram
HCLO	Hipokloröz asit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
KOH	Potasyum Hidroksit
L	Litre
Log	Logaritma
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Na_2SO	Sodyum Sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nm	Nanometre
Ppm	Milyon başına parça

Kısaltmalar

3D	Üç Boyutlu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AHL	N-açil homoserin lakton

AI	Autoinducer
Al-2	Otoindükleyici 2
AIP	Otoindükleyici peptidler
ATP	Adenozin trifosfat
BAP	Biyofilm birleşmiş protein yapısı
BHIA	Brain heart infusion agar
BSA	Bovine Serum Albumin
CCP	Kritik kontrol noktalarının
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CIP	Yerinde Temizlik
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
D	Dezenfektan
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz Enzimi
DspB	Dispersin B
eDNA	Ekstraselüler DNA
EN	Avrupa Standartları
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FISH	Floresan in situ Hibridizasyon
GMP	Guanozin Monofostat
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
MIC	Mimimum İnhibitor Konsantrasyon
MSCRAMM	Yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri
N	1 dakika dezenfektan uygulamasıda yüzeyde canlı kalan bakteri sayısı (Log CFU/cm^2)
N_0	Baslangıç bakteri sayısı (log CFU/cm^2)
NP	Nanopartikül

OD	Optik Dansite
QS	Quorum Sensing
PAA	Perasetik asit
pH	Hidrojenin Gücü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	Polietilen
PIA	Polisakkarit hücreler arası adhezin
PNAG	Poli-N-asetil glukozamin
PP	Polipropilen
PVC	Polivinil Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Restoran
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SF	Serum Fizyolojik
Spp.	Türler
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviyole

ÖZET

Kement, N. (2021). Gıda İşletmelerinde Patojenler Tarafından Oluşturulmuş Biyofilmler Üzerine Nanoteknolojik Dezenfektanların Etkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu biyofilmlerin dezenfektan ve antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç, bu topluluklar ile mücadele için farklı yöntemlerin uygulanması konusunda araştırmalar yapılmasını gerektirmiştir. Bu çalışmada, biyofilm kontrolü ve önlenmesinde gıda işletme yüzeylerinde patojenler tarafından oluşturulmuş biyofilmlere karşı gümüş nanopartiküller kullanılarak oluşturulan dezenfeksiyon sisteminin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda önce dezenfektan ham maddeleri gümüş nanopartikül (Ag NP), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit (HClO) seçilerek kullanılmış, gıda patojeni olarak bilinen *Salmonell*a Enteriditis, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157 üzerinde etkinlikleri belirlenmiştir. Akabinde 8 farklı gümüş nanopartikül içerikli dezenfektan karışımı hazırlanmış ve gıda patojenleri *Salmonell*a Enteriditis, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157 bakterilerinin 7 günlük biyofilmleri üzerinde etkinlikleri test edilmiştir. Dezenfektan karışımlarının etkinliklerinin kontrolü kültürel yöntemlerin kullanımı dışında taramalı elektron mikroskobunda görüntüleme ile yapılmış, canlı sayılarının azalması dışında yüzeyin ve biyofilm bakterilerinin morfolojik incelemesi yapılmıştır. Ardından İstanbul'da bulunan bir restoran zincirinin mutfaklarındaki biyofilm oluşumuna uygun yüzeylerde uygulama yapılmıştır. Çalışma sonucunda gümüş nanopartikül içerikli dezenfektanların patojen bakterilerin oluşturdukları biyofilmler ve gıda işletmelerinde biyofilm oluşacak yüzeylerin dezenfeksiyonunda oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilmler, gıda güvenliği, gümüş, nanopartiküller, dezenfektanlar

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2019-34310

ABSTRACT

Kement, N. (2021). The Effect of Nanotechnological Disinfectants on Biofilms Formed by Pathogens in Food Facilities. The University of Istanbul – Cerrahpaşa, Institute of Graduate Education, Department of Food Hygiene and Technology. Doctoral Dissertation. Istanbul.

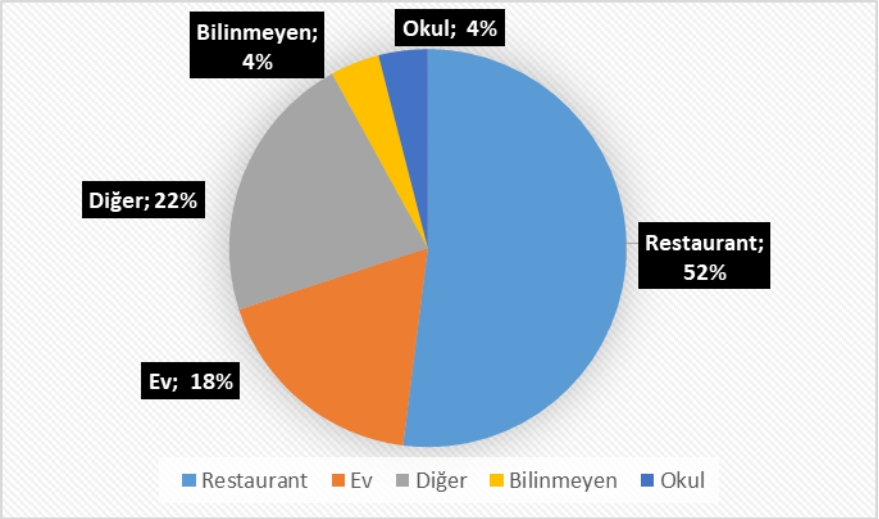
The resistance developed by biofilms formed by microorganism communities against disinfectants and antibiotics requires förder research on the application of different methods to combat these communities. In this study, it was aimed to determine the effect of disinfection system created by using silver nanoparticles against biofilms formed by pathogens on food facilities surfaces for biofilm control and prevention. In this direction, firstly, disinfectant raw materials silver nanoparticle (Ag NP), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hypochlorous acid (HClO) were selected and used, and their activities were determined on *Salmonella* Enteriditis, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157, which are known as food pathogens. Afterwards, 8 different disinfectant mixtures containing silver nanoparticles were prepared and their effectiveness on 7-day-old biofilms of food pathogens *Salmonella* Enteriditis, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 bacteria were tested. The control of the effectiveness of disinfectant mixtures was made by the use of cultural methods and scanning electron microscopy. Morphological examination of the biofilm bacteria and surface was carried out, except for the decrease in the number of living cells. Then, the disinfection application was made on surfaces suitable for biofilm formation in the kitchens of a restaurant chain in Istanbul. As a result of the study, it has been determined that disinfectants containing silver nanoparticles are very effective in the disinfection of biofilms formed by pathogenic bacteria and on surfaces that biofilm may ocur in food facilities.

Key Words: Biofilms, food safety, silver, nanoparticles, disinfectants

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2019-34310

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre Avrupa'da her yıl yaklaşık 5000 kişinin hayatına mal olan ve toplamda 23 milyon insan gıda kaynaklı enfeksiyon veya zehirlenme yaşamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise, her yıl yaklaşık 2,2 milyon kişinin gıda kaynaklı hastalıklar nedeni ile hayatını kaybettiği rapor edilmiştir. Bu veriler buz dağının görünen kısmını yansıtmakta olup, kayıtlı olmayan vakalar ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Günümüze kadar yürütülen çalışmalarda gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli kaynaklarından birinin biyofilmler olduğu belirtilmiştir (WHO 2015). Restoranlarda tüketilen yemekler sebebi ile meydana gelen gıda kaynaklı hastalık salgınlarının oranı belirsiz olmakla birlikte, bu yemekler önemli bir salgın kaynağı olarak kabul edilmektedir (Jones ve Angulo 2006). Gelişmiş ülkelerde meydana gelen gıda kaynaklı hastalıkların %70'inin, toplu tüketim işletmelerinde hazırlanan gıdalarla bağlantılı olduğu tahmin edilmektedir (Alsayeqh 2015).



Şekil 1-1.1. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezine (CDC) 1998-2004 döneminde bildirilmiş gıda kaynaklı hastalık salgınlarının kaynakları (Jones ve Angulo 2016)

Bakteriyel enfeksiyonlar insan sağlığı açısından sorun oluşturan önemli nedenlerinden biridir (Klevens ve ark. 2007). Bu enfeksiyonlar mikroorganizmaların yüzeylere yapışması ile başlayıp, mikrobiyal kolonilerin oluşumuyla devam eder ve

biyofilm oluşumu gelişir (Bryers 2008). Doğrudan mikroskopik gözlemler ve direkt kantitatif geri kazanım teknikleri patojen bakterilerin %99,9'dan fazlasının çeşitli yüzeylerde biyofilmler içinde ürediğini göstermektedir (Arampatzi ve ark. 2011). İnsanlarda görülen bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık %80'inin biyofilmlerde yaşayan mikroorganizmalar ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Türkiye'de konu ile ilgili veri bulunmamakla birlikte biyofilmlerde yaşayan mikroorganizmaların dünyanın en gelişmiş ülkelerinden ABD'de yıllık amfizem, AIDS, Parkinson hastalığı ve cinayetlerin toplamından daha fazla ölümden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Klevens ve ark. 2007).

Gıda üretimi yapılan ortamlarda biyofilm oluşturan bazı mikroorganizma türleri, insanlarda patojen olmaları nedeni ile gıda endüstrisinde özellikle önemlidirler. Bu patojenler, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan paslanmaz çelik, polietilen, ahşap, cam, polipropilen, kauçuk vb. farklı yapay yüzeyler üzerinde biyofilm yapıları geliştirebilmektedirler (Abdallah ve ark. 2014; Colagiorgi ve ark. 2017).

Mikroorganizma toplulukları tarafından oluşturulan biyofilmlerin, katı yüzeylere özellikle kireçli, cilalanmamış ve metal yüzeylere daha kolay tutunduğu görülmüştür. Endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak kabul edilen biyofilmlerin, son dönemde tıp alanında da dental plaklara ilave olarak yabancı cisimlerden kaynaklanan enfeksiyonlar başta olmak üzere birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı bildirilmiştir (Costerton ve ark. 1999). Metallerde oluşan tüm korozyon zararının yaklaşık %20'sinin mikrobiyolojik kökenli olduğu ileri sürülmektedir (Javaherdashti 2008).

Biyofilm üretebilen çok sayıda mikroorganizma olmasına rağmen *Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus* ve *Bacillus spp*. benzeri bazı bakteriler biyofilm oluşturmaya daha eğilimlidirler. Bu bakteriler planktonik formları ve sesil formları farklı oluşum oranları ve geçişler göstermektedir (Kumar ve Anand 1998; Donlan 2002; Chmielewski ve Frank 2003). *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Cronobacter sakazakii, Campylobacter jejuni, Bacillus cereus*

ve *Staphylococcus aureus* gibi patojenik bakterileri içeren biyofilmler gıda endüstrisi açısından önemlidir (Poulsen 1999; da Silva ve De Martinis 2013).

Gıda kaynaklı intoksikasyon ve enfeksiyonlar gıda matriksleri veya fabrika ekipmanları üzerinde oluşan bakteriyel biyofilmler yoluyla ortaya çıkabilmektedir. Toksinler, gıda işleme tesislerinde bulunan biyofilm tarafından salgılanabilmektedir. Oluşan bu toksinler bir gıda matrisini kirleterek, bireysel veya çoklu zehirlenmelere neden olabilmektedirler (Galie ve ark. 2018). Jones ve Angulo'ya (2016) göre; gıda toplu tüketim hizmeti verilen restoran vb. alanlarda gıdalardan bulaşmayı engellemek için daha fazla önlem alınması gerekmektedir. Gıda kaynaklı hastalık salgınlarının araştırıldığı sayısız rapora göre restoranlarda gıda kaynaklı hastalıklara çapraz kontaminasyonun sebep olduğu görülmüştür.

Biyofilmlerin oluşum ve gelişiminin sınırlandırılmasında biyofilm daha oluşmadan gereken önlemlerin alınması ilk adımdır. Gıda işletmelerinde yeterli ve belirli sıklıkta uygun ve etkili temizlik işlemi ve ardından etkili bir dezenfeksiyon uygulaması yapılmalıdır. Gıda işletmelerinde temizlik işleminde mekanik kuvvet kullanılarak biyofilm yüzeyden uzaklaştırılmaktadır. Günümüzde elektriksel alanlar, katalize modifiye yüzeyler, ultrason, enzimler, amonyak ve formaldehit, deterjan maddeleri, yüksek basınçlı temizleme sistemleri gibi yöntemler biyofilm oluşumunu engellemede tercih edilmektedir (Ünal ve Tayfur 2017). Ancak, antimikrobiyal maddelere daha az yanıt veren ve mikroorganizmaları dış etkilerden koruyan biyofilmlerin gelişmesi nedeniyle bakterisidler ve diğer yöntemler başarısız olabilmektedir (Steward ve ark. 2001). Mevcut antibiyotiklere dirençli patojenik bakteri suşlarının gelişimi halk sağlığı için ciddi tehdit oluşturması, yeni bakterisidlerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (Rai ve ark. 2009). Gümüşün antimikrobiyal özelliği yüzyıllardır bilinmekle birlikte nanoteknolojinin gelişimine paralel olarak üretilen gümüş nanopartiküller giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Markowska ve ark., 2013). Gümüş nanopartiküller, çok sayıda patojen mikroorganizma üzerinde etkili yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Geniş patojen mikroorganizma ve parazit yelpazesine karşı oldukça etkili olmasının ve direnç gelişimine sebep olmamasının yanı sıra insanlarda düşük sistemik toksisiteye sahip

olmaları dolayısı ile gümüş nanopartiküller büyük ilgi görmektedir. Mükemmel antimikrobiyal özellikler nedeniyle, gümüş (Ag) nanopartiküller gıda ambalajlarında, gıda ve tohum muhafazası, biyo-gübreler, kozmetik ve ilaçlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Mohanta ve ark., 2017).

Bu çalışmada faklı büyüklükteki ve konsantrasyondaki gümüş nanopartiküller ile geliştirilmiş dezenfektanların gıda işletmelerinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar üzerine etkisi araştırılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyofilmlerin Tanımı ve Oluşum Sebepleri

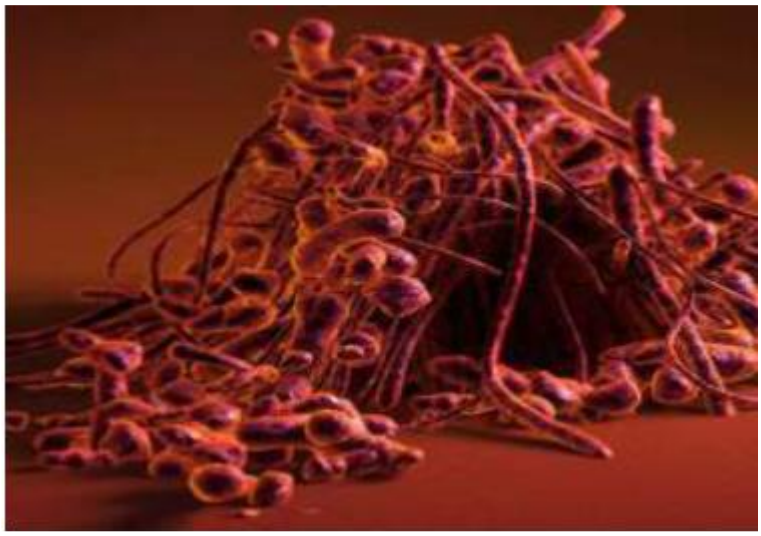
Biyofilm, büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değişik bir fenotip sergileyen, kendi ürettikleri extraselüler matris içine gömülü, birbirine, bir substrata ya da bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanmış hücreler ile karakterize edilen mikrobiyal olarak türetilmiş sesil topluluktur (Costerton ve ark. 1999; Donlan ve Costerton 2002; Branda ve ark. 2005). Biyofilm tabakaları tek bir canlı türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla canlı türü tarafından oluşturulabilmektedir (Altun ve Şener 2008). Daha çok bakteri, alg, protozoa ve maya gibi birçok hücre tipinden oluşmaktadır. Biyofilmler yüzlerce farklı mikrobik hücre içermektedir (Ungvarsky 2018). Biyofilmler; aralarında iletişim kurarak haberleşebilen, ürettikleri polisakkarit bir matriks tarafından çevrelenen ve yüzeylere tutunabilen, kompleks yapıdaki polimikrobiyal bir topluluktur (Hepdeniz ve Seçkin 2017). Uygun şartlar altında bakteriler canlı hücreler ya da cansız yapılar üzerine yapışarak ürettikleri jelsi eksopolisakkarit olarak adlandırılan bir ağ yapı içinde bölünüp çoğalarak biyofilm oluşturabilmektedirler (Whitchurch ve ark. 2002). Caldwell ve ark. (1997) mikroorganizmalardan oluşan bir kitlenin biyofilm olarak ifade edilebilmesi için; beraber organize olabilme özelliği, çevresel etmenlere karşı direnç, biyofilm topluluğu durumundayken planktonik hallerinden daha etkili olma ve çevresel etmenlere tek başına karşılık vermek yerine, daha çok kitle halinde karşılık verme özelliklerini taşıması gerektiğini belirtmişlerdir.

Biyofilm yapısında %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır (Altun ve Şener 2008). Hücre dışı matris esas olarak selüloz benzeri polisakkaritler, proteinler veya ekzojen DNA gibi maddelerden oluşmaktadır. Bu matris sert yüzeylere (gıda endüstrisi ekipmanı, nakliye, dağıtım ve depolama yüzeyleri, toprak vb.) ya da biyolojik yapılara (sebze, et, kemikler, meyveler vb.) tutunmaktadır (Flemming ve ark. 2016). Yüzeye yapışan bakterinin ailesine ve cinsine göre biyofilmde, tek bakteri türü homojen bir yapı veya farklı

bakteriler birlikte hareket ederek heterojen bir yapı oluşturmaktadır (Watnick ve Kolter 2000).

Biyofilmin ana iskeleti, polisakkarit kompozisyonu ve yapısını belirlemektedir. Biyofilm yapısı bulunduğu ortam ve zamana bağlı olarak değişkenlik göstermektedir ve birbirlerine benzememektedirler. Biyofilmde üretilen ekstraselüler polimerik madde (EPS) miktarı biyofilmin yaşına ve bakteri türüne değişmektedir (Sutherland 2001; Steward 2001).

Biyofilm içinde oksijen mevcudiyeti ve besin rekabeti sebebi ile farklı mikrobiyal türleri içeren katmanlar bulunmaktadır (Zhang ve ark. 1998). Biyofilmdeki alt katmanlara doğru gidildiğinde anaerobik bakteriler için yaşam alanı oluşturacak şekilde çözünmüş oksijen oranının azaldığı görülmektedir (Hibiya ve ark. 2003). Bu alt katmanlarda bulunan bakterilerin daha düşük besin ve oksijen gereksinimi bulunduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Brown ve ark. 1988). Şartların uygun olduğu durumlarda yüzeylerde canlı mikroorganizmaların birikimi şeklinde bilinen biofouling gelişimi artarak kalın biyofilmler oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak, bakteri hücrelerinin farklı büyüme oranı ve fizyolojisi antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direncin artmasına yol açmaktadır (McFeters ve ark. 1995). Biyofilmlerin planktonik bakterilerden farklı bazı özellikleri bulunmaktadır. Hücreler arası sinyalleşme sistemi (Quorum sensing (QS)), sinyal molekülleri üretir ve biyofilmin gelişimini düzenlemektedir. Siklik nükleotid ikinci haberciler: siklik-diguanosin-GMP, flagellar motiliteyi (devinimi) etkileyerek biyofilm oluşumunu ve yayılımını ayrıca hücredışı polisakkaritlerin bağlanma ve üretimlerini düzenlemektedir. BAP proteini (biofilm associated protein) matris iskele proteinlerini biraraya getirerek biyofilm matrisi oluşturmaktadır (Zhao ve ark. 2017).



Şekil 2-1.1. Biyofilmin 3 boyutlu görüntüsü (Çiftçi 2005)

Biyofilm oluşumu; su aktivitesi, besin ihtiyacı, antimikrobiyal madde içeriği, pH değeri, asidite, oksijen değişkeni ve elektriksel değişkenlik gibi iç faktörler ile yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey pürüzsüzlüğü, sıvının akış hızı, sınırlı besin maddesi gibi dış faktörlere de bağlıdır (Donlan ve Costerton 2002; Douglas 2003). Mikroorganizma kommünlerinden oluşan biyofilmlerin yapısı, mikroorganizmaların kolonizasyonunu desteklemektedir, pH değişikliği, besin yetersizliği gibi olumsuz dış ortam koşullarına, antibiyotik, dezenfektan madde gibi kimyasallara karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Kompleks bir yapı olarak biyofilm oluşumu, polisakkaritler, protein, ekstraselüler DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içeren dinamik bir prosestir (Marcinkiewicz ve ark. 2013). Bu kompleks yapıları, oluşan biyofilme, farklı koşullarda ortama uyum sağlama ve içeriğindeki mikroorganizmaların direnç mekanizmalarının gelişmesi gibi özellikler kazandırmaktadır. Biyofilm oluşumu için gerekli olan üç ana komponent sırasıyla; mikroorganizmalar, bir bağlanma yüzeyi ve çevresel ortamdan oluşmaktadır (Donlan 2002).

Bakteriler doğal ve endüstriyel sistemlerde biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm oluşturma, bakterilerin antibakteriyel kimyasallardan (doğal antibiyotikler dâhil), çevresel bakteriyofajlardan ve fagositlerden korundukları bir hayatta kalma stratejisidir. Biyofilm ile ilişkili mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı önemli ölçüde azaltmaları nedeni ile biyofilmler halk sağlığı için büyük öneme sahiptir. Bu nedenlerden dolayı, kronik biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar antibiyotik tedavisine

dirençlidir ve konak temizleme mekanizmalarına karşı da olağanüstü derecede dirençlidir. Birçok kan dolaşımı enfeksiyonu ve idrar yolu enfeksiyonu, kalıcı tıbbi cihazlarla dolayısı ile (çoğu durumda) biyofilmle ilişkilidir (Arampatzi ve ark. 2011).

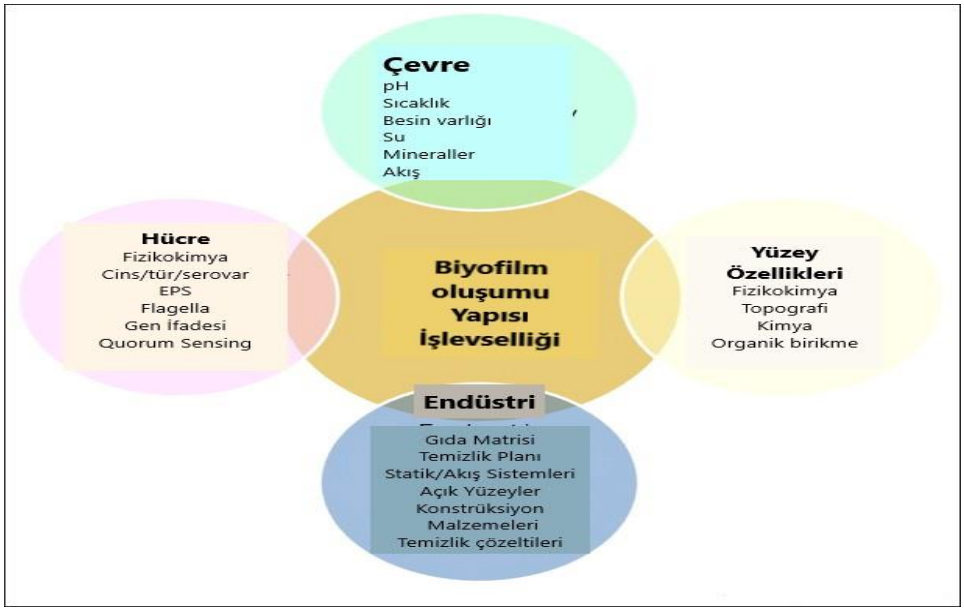
Biyofilm oluşturma, bakterilerin UV (ultraviyole) hasarı, metal toksisitesi, anaerobik koşullar, asit maruziyeti, tuzluluk, pH gradyanları, kuruma, bakteriyofajlar ve amipler gibi stres koşullarında hayatta kalmasına ve antibiyotiklere, antimikrobiyallere ve konakçı bağışıklık savunmasına direnmesini sağlamaktadır (Kırmusaoğlu 2016). Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, koşullar ideal olmasa da kendi türlerinin yaşayabileceği kendi mikro çevrelerini geliştirmektedir. Düşman ortamından korunmanın yanı sıra, biyofilmler mikroorganizmaların besinleri alması için bir tuzak görevi görmektedir (Poulsen 1999). Mikroorganizmalar, dış etkilerden korunmak, besin maddelerine ulaşmayı kolaylaştırmak, farklı mikroorganizmalar ile iletişim kurmak ve farklı mikroorganizma çeşitleri ile sinyal yöntemi ile haberleşerek, ortam koşullarına uygun, yeni ve farklı genetik özellik ve davranış biçimleri yapmak için biyofilm oluşturmaktadır (Jefferson 2004).

2.2 Biofilm Oluşumu Aşamaları

Mikroorganizmalar, koşullar uygun olduğunda yüzeylere ve birbirlerine tutunarak biyofilm yapısını oluşturmaya başlamaktadır (Davey ve O'toole 2000). Biyofilm oluşumu; bağlı hücrelerin yüzey hareketliliği ile yeniden ortama dağılımı, bağlı hücrelerin bölünerek çoğalması veya hücrelerin ara sıvıdan (bulk fluid) gelişmekte olan biyofilme alınması şeklinde üç farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Biyofilmlerin yapısal olgunluğa ulaşması 10 günden fazla sürmektedir (Stoodley ve ark. 2002). Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kabiliyeti, besin bulunabilirliği, savunma, adezyon ve koloni oluşturma, hücrelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, topluluk oluşturma, bağlanılan yüzeyin özellikleri, yüzey üzerinden akan akışkanın özelliği, mikroorganizma sayısı ve çevresel koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Costerton ve ark. 1987). Biyofilm oluşumunda genler, biofilm tabakası oluşturmak için polisakkarit, peptidoglikan, hücre içi adezin, otolizin, haberleşme sinyalleri, yüzey ve kontrol proteinleri ve benzeri maddelerin sentezlenmesini başlatmaktadır (Jefferson 2004). Mikrobiyal türler ve suşların karakteristiği, yüzey bileşimi ve pürüzlülüğü,

akışkan ortamının bileşimi (örn. pH, sıcaklık ve iyonik mukavemet), akışkan sıvının hidrodinamiği (hız ve türbülans) gibi pek çok faktör biyofilm oluşumunu ve biyofilmlerin özelliklerini etkilenmektedir (Melo 2003). Ayrıca sıcaklık, ozmolarite, pH, demir ve oksijen varlığı gibi çevresel faktörler biyofilm oluşumunu etkilemektedir (O'Toole ve ark. 2000).

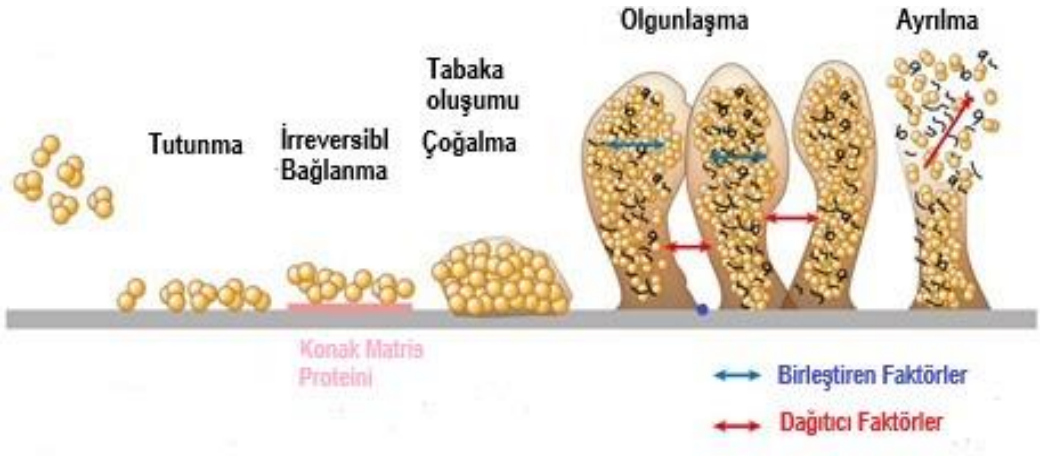
Tek tabakalı biyofilm, yüzeye yapışan hücrelerin tek bir tabakası olarak tanımlanmaktadır. Bu tip yapı, hücre-hücre etkileşimleri yerine hücre-yüzey etkileşimleri baskın olduğunda tercih edilmektedir. Çok tabakalı bir biyofilmi, bakterinin hem yüzeye hem de komşu bakterilere bağlandığı bir biyofilm olarak tanımlanmaktadır. Çok katmanlı bakteriyel biyofilmler, başka bir organizmanın, abiyotik bir çevre yüzeyinin veya bir hava-su ara yüzünün iç veya dış yüzeylerinde oluşmaktadir. Dağılmış hücre agregatları biyofilmlerle ilişkili özelliklerin çoğunu göstermektedir. Bakteriler bir yüzeye ve birbirlerine yapışabildiklerinde çok katmanlı bir biyofilm gelişmektedir. Hücreler arası yapışmalar, bir dış yapışkan bakteri yüzeyi gerekmektedir. Birçok ortamda, bakterilerin yüzey özellikleri itmeye yol açmaktadır. Çok tabakalı biyofilm genellikle ekzopolisakkaritler, proteinler ve DNA'yı içerebilen bir hücre dışı matris ile birlikte oluşmaktadır (Karatan ve Watnick 2009).



Şekil 2-2.Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumunu, yapısını ve işlevselliğini etkileten faktörler (Whitehead ve Verran 2015)

Literatürde hazırlayıcı tabaka (conditioning film) olarak bilinen tabaka, organik moleküller ve likit fazın birleşerek, yüzey ve su temas halindeyken yüzeyi kaplaması ile oluşmaktadır. Bakteri hücreleri bu alana taşınarak yüzeye yapışırmaktadırlar ve uygun ortam oluştuğunda çoğalıp büyüyerek biyofilm meydana getirmektedirler (Watnick ve Kolter 2000). Mikroorganizmalar bu hazırlayıcı tabaka yüzeyine yapışmaktadır. Bakterilerin yapışması başlangıçta geri dönüşümlüdür (van der Walls çekim kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve hidrofobik etkileşimler) ve daha sonra geri dönüşümsüzdür (dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlanma ve hidrofobik etkileşimler). Bakteriyel uzantılar flagella, fimbria ve ekzopolisakkarit fibrilleri (glikokaliks, balçık veya kapsül olarak da bilinir) hazırlayıcı tabaka ile temasta yer almaktadır. Ekzopolisakkaritler, hücre-hücre ve hücre-yüzey yapışmasında önemlidir ve ayrıca hücreleri dehidrasyondan korumaktadırlar (Forsythe 2000). Biyofilm oluşumu bir dizi olayın zincirleme gelişmesi sonucunda gerçekleşmektedir (Özer 2016). Biyofilmlerin oluşması 5 aşamaya ayrılarak incelenmektedir:

1. Mikroorganizmaların yüzey veya birbirleri ile temasa başlaması,
2. Film tabakasında mikroorganizma agregasyonu,
3. Film tabakasındaki hücrelerin ekstraselüler matriks oluşturması,
4. Biyofilmlerin bakteri ve/veya ortam koşullarına bağlı olarak modifikasyonu
5. Biyofilmin ortamdan (yüzeyden) ayrılmasıdır (Costerton ve ark. 1995).



Şekil 2-3. . Biyofilm oluşum aşamaları modeli (Otto 2013).

Bir yüzey ve bir sulu ortam arasındaki katı-sıvı arayüzü (örn. su, kan) mikroorganizmaların bağlanması ve büyümesi için ideal bir ortam sağlamaktadır. Biyofilmin yüzeye bağlanmasında substratın etkileri, substratın üzerinde oluşan filmin koşulları, sulu ortamın hidrodinamiği, ortam özellikleri ve hücre yüzeyinin çeşitli özellikleri önemli rol oynamaktadır (Donlan 2002).

2.2.1 Bakterilerin Yüzeye Tutunması ve Biyofilm Oluşumu

Mikroorganizmaların farklı özellikteki yüzeylere tutunabilme kabiliyetlerinden dolayı biyofilm oluşturma ve gelişimleri yüzey koşullarına göre değişmektedir (Mafu ve ark. 1990). Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere ilk etkileşimleri, geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma şeklinde iki farklı şekilde gerçekleşmektedir (Zhao ve ark. 2017). Mikroorganizmalar besin varlığını araştırmak için biyofilm yapısı oluşturmadan, temas ettikleri yüzeye geri dönüşümlü tutunmalar oluşturmaktadır. Geri dönüşümlü tutunmadaki zayıf etkileşimler, yüzeydeki çevresel koşullar ve besin miktarı yaşamlarını sürdürmek için yeterli ve uygunsa, yerini iyonik ve kovalent bağlar gibi güçlü bağlara bırakarak bakteri hücreleri yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmaktadır (Donlan 2002).

Planktonik formdaki hücrelerin suda hareket ederken salgıladığı protonlar ve sinyal molekülleri bakteri daha yaklaşmadan radyal şekilde yayılmaktadırlar. Bakteri yüzeye gerekli miktarda yaklaştığında proton ve sinyal moleküller yüzeye çarparak geri dönmektedirler, bu şekilde proton ve sinyal molekülleri konstantrasyonları bakteri ile yüzey arasında artmaktadır. Mikroorganizmalar yüzeye yaklaşması; aktif hareket, difüzyon, Brownian hareketi veya su akışı ile gerçekleşmektedir (Morisaki ve ark. 1999). Bakteriler yüzeye kritik yakınlığa gelindiği zaman (yaklaşık 1 nm), itici ve çekici kuvvetlerin yardımı ile itilmektedir veya yüzeye yapışmaktadırlar. Elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen ve van der Waals bağlarının kuvveti, asit-baz etkileşimi, mikrotopoloji gibi sterik etkileşimler, hidrodinamik güçler, itici ve çekici kuvvetleri oluşturmaktadır ve spesifik olmayan bağlanmada görev almaktadır (Christensen 1989).

Biyofilm oluşumunda ilk evre, planktonik formdaki mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümlü bağlanması olarak adlandırılan tutunma aşamasıdır. Flagella hareketi ve tutunduğu yüzeyle arasındaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler

(Brownian hareketi) sayesinde kısa sürede bakteriler yüzeye tutunmaktadır (Lejeune 2003). Mikroorganizmalar geri dönüşümlü tutunmada yüzeylerle çok kolay bozulabilen zayıf etkileşimler kurmaktadır. Bu aşamada, bakteri taşıyıcı yüzeye flagella, pili ve az miktarda EPS gibi bazı ekstraselülar organeller yardımı ile yapışmaktadır (Klausen ve ark. 2003). Henüz morfolojik farklılaşma serisinde değişiklikler tamamlanmadığından, geri dönüşümlü tutunma aşamasında orjinal planktonik yaşam tarzına geri dönmek kolaydır (Flemming ve ark. 2007), bu evrede yüzeye bağlanan mikroorganizmalar kalıcı yapı kurmamaktadır (Lindsay ve von Holy 2006).

Mikroorganizmaların yüzeylere ilk tutunmasında van der Walls kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler rol oynamaktadır (Van Loosdrecht ve ark. 1987; Carpentier ve Cerf 1993). Bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklü olduğu için elektrostatik etkileşimler çoğunlukla itici kuvvetlerdir (Poulsen 1999). Çoğu hücrenin negatif yük taşımasının sıvı akışı ile şarj olan yüzeye yapışmayı kolaylaştırıldığı bildirilmiştir. Fimbria ve benzeri yapılar hücrelerin hidrofobik özellikte kalmasına yardımcı olmaktadır, incelenen çoğu fimbria yapısında hidrofobik aminoasit kalıntıları bulunmuştur. Yüzeyle arada bulunan akıma karşı gelen fimbria tutunmayı sağlamaktadır (Bullitt ve Makowski 1995). Bakteriler fimbriaları ya da salgıladığı polimerler sayesinde yüzeye tutunmaktadır. Fimbria ile tutunma gerçekleşirse bakteri tutunduğu yüzeyden ayrılabilmektedir (Pasmore ve ark. 2002). Bunların dışında bakterilerin yüzeye tutunmasında flagella, pili, hücre yüzeyi molekülleri (lipopolisakkarit, lipoprotein, membran proteinleri, adezyon vb.) önemli rol oynamaktadır. Ayrıca hidrojen bağları, bu aşamada rol oynamaktadır (Grasso ve ark. 1996).

Bakteriyel yüzeye tutunma prosesinde, gerekli gen ürünleri, bakteri türleri, yüzey bileşenleri ve çevresel değişkenler gibi ana öğeler bulunmalıdır. Canlı ya da cansız hale getirilmiş dokulara tutunma, biyofilmde bulunan hücrelerinin ürettiği spesifik moleküller olan lektin, ligand ya da adhezin benzeri moleküller aracılığıyla oluşmaktadır, öte yandan bakterilerin cansız yüzeylere tutunması genellikle spesifik olmayan hidrofobik bağlar gibi etkileşimler sayesinde gerçekleşmektedir (Carpentier ve Cerf 1993).

Tablo 2-1. Hücre tutunması ve biyofilm oluşumunda önemli değişkenler (Donlan 2002)

Yüzeyin özellikleri	Ara sıvının özellikleri	Hücrenin özellikleri
Doku veya pürüzlülük	Akış hızı	Hücre yüzeyi hidrofobisi
Hidrofobi	pH	Fimbriyalar
Hazırlık tabakası	Sıcaklık	Flagella
	Katyonlar	Hücre dışı polimerik maddeler
	Antimikrobiyal ajan varlığı	

2.2.2 Bakteri Hücrelerinin EPS Üreterek Yüzeye Bağlanması

Geri dönüşümsüz tutunma biyofilm oluşumunda ikinci aşaması olup, bu aşamada bakteriler ve yüzey arasındaki etkileşim güçlenmekte ve ilk tutunmayı sağlayan flagella, fimbriya ve pili gibi uzantılar, tutunma yüzeyinin elektriksel katmanının fiziksel itici güçlerinden daha etkili hale gelmektedir (Kumar ve Anand 1998). Bakteri hücreleri EPS üretimi dışında flagella (kamçı) ve pili (ince kıl) gibi organelleri ile yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanmaktadır (Poulsen 1999). Bakteriler geri dönüşümlü olarak yüzeye bağlandıktan sonra bakteri hücreleri çoğalmaya ve EPS üretimine başlamaktadır. Yüzeye tutunmuş bakterinin hücre membranındaki proteinlerinin uyarımı gerçekleşerek bakteri hücreleri arası iletişim mekanizmaları devreye girmektedir. Bu aşamada bakteri hücresi, EPS sentezlemeye başlamaktadır (Lindsay ve von Holy 2006). Gerçekleşen ilk tutunma süresince organik ve inorganik moleküller yığın şeklinde difüzyon veya türbülanslı akış ile yüzey boyunca taşınmaktadır (Kumar ve Anand 1998). Bu maddeler bakterinin türüne ve çevresel etmenlere göre farklı yapıda olup, çoğunlukla ekzopolisakkaritler, ekstraselüler DNA ve proteinlerden oluşan biyofilm matriksinin temel bileşenlerini oluşturmaktadırlar. Mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz bağlanmasına bu matriks ve içeriğindeki maddeler aracılık etmektedir (Donlan 2002). Mikroorganizmaların yüzeylere bağlanmasında geri dönüşümlü tutunmadan geri dönüşümsüz tutunmaya

geçişi, EPS varlığında bakteri hücrelerinin oluşturduğu zayıf bağların kalıcı bağlara dönüşmesidir (Stoodley ve ark. 2002).

EPS'lerin ana bileşenleri PIA, eDNA, protein, lipitler ve benzerlerini içermektedir. Bu bileşenler çevresel faktörler değiştiğinde, oluşan değişiklikler yüzeydeki tutunmayı teşvik ederek, geri dönüşümsüz tutunmaya doğru yönlendirmektedir (Flemming ve ark. 2007). Geri dönüşümlü tutunma aşamasında, bakteriler tarafından salgılanarak bakteri ve yüzey arasında güçlü bir etkileşim oluşturan EPS'lerin seviyesi belirli bir dereceye ulaşıp daha sonra biyofilm geri dönüşümsüz tutunma aşamasına girmektedir. Geri dönüşümlü tutunma aşamasından geri dönüşümsüz tutunma aşamasına kadar geçen süre birkaç dakikadan kısadır (Palmer ve ark. 2007). Geri dönüşümsüz tutunmada hücreler tarafından salgılanan EPS'ler hücrenin yüzeye yapışma oranını arttırırak, yüzeyden uzaklaşmasını zorlaştırmaktadır (Zhao ve ark. 2017). Proteinler gibi organik moleküllerin bakterilerin yüzeye tutunmasının önemli bir rolü vardır. Biyofilm matrisi içinde yüzey proteinleri dağılımı düzenli bir şekilde oluşmaktadır. EPS varlığında bu proteinlerin bazıları, biyofilm oluşumunu özendirebilmektedir. Biyofilm birleşmiş protein yapısının (BAP), mikroorganizmanın yüzeyde kolonileşme ve devamlı kalmasının sağlanması açısından önemli olduğu belirtilmektedir (Tormo ve ark. 2005; Lasa ve Penadés 2006).

Geri dönüşümsüz tutunmada, etkili olan faktörler hücre ve yüzey arasında oluşan zayıf etkileşimler, hücre ve yüzey arasındaki dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimler gibi kısa zincirli etkileşimlerdir (Kumar ve Anand 1998). Geri dönüşümsüz tutunma gerçekleştikten sonra oluşan biyofilmi yüzeyden uzaklaştırmak zorlaşmaktadır ve uzaklaştırmak için mekanik kuvvetlere, güçlü ve etkili dezenfektanlara, deterjanlara, enzimlere, yüksek ısıl işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Sinde ve Carballo 2000; Augustin ve ark. 2004).

2.2.3 Koloni oluşumu

Biyofilm oluşumunun en önemli aşaması mikrokolonizasyon olarak da adlandırılan biyofilmin üç boyutlu büyümesi olan yüzey kolonizasyonudur (Chmielewski ve Frank 2003). Geri dönüşümsüz olarak yüzeye tutunmuş bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturmaya başlamaktadır. Aynı ortamda

bulunan planktonik bakteriler mikrokolonilere yapışarak kolonizasyonu desteklemektedir. Biyofilmler koloniler arası su ve besin maddelerinin dağıtıldığı kılcal damar şeklinde su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapıda olup, birden fazla türden mikroorganizmanın oluşturduğu toplulukları içeren biyofilm yapılarında, türler kendilerine ait mikrokoloniler oluşturmaktadır, besin ve suyun difüzyonu ise koloniler arasındaki kanallar ile gerçekleşmektedir (Huang ve ark. 2001; Van Loosdrecht ve ark. 1990). Kılcal kanallardaki dolaşım pasif difüzyon, dışarıdan besin alımı ise kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleştirilmektedir (Klausen ve ark. 2003). EPS matrisinde bulunan polimerlerin dağılım şekli, mikroorganizmalarının biyofilmdeki üremesi ve oluşan mikrokolonilerin miktarını etkilemektedir. Mikroorganizmaların EPS matrisi yaşam düzeni kılcal su kanalları kullanılarak sağlanmaktadır. Kılcal yollar ile hem suda çözünmüş formda besinler ve oksijen dolaşmaktadır hem de mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerinin atıkları ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Biyofilmin büyümesi ve mikroorganizmaların çoğalması için matris içerisindeki organizasyon düzenli olmalı ve mikrokolonilere gerekli besin ve oksijenin bakteri hücrelerine iletimi kolayca sağlanmalıdır (Poulsen 1999). Biyofilmin organizasyon yapısı hücre-hücre sinyalleri hidrodinamik özellikler, bakterilerin büyüme oranı, EPS üretimi ve bakteri hareketliliği gibi biyolojik faktörlerden etkilenmektedir (Stoodley ve ark. 2002).

Mikroorganizmaların salgıladığı EPS, yüzeyi çevreleyen mikrokolonileri yapıştıkları yüzey boyunca ince bir tabaka halinde bağlamaktadır. Bu aktivite, yüzeyi daha fazla planktonik bakterilerin bağlanmasına daha elverişli hale getirmektedir (Huang ve ark. 2011). Yüzeye yapışan bakteriler, EPS salgılayarak komşu bakterileri mikrokoloniler adı verilen kümeler halinde toparlamaktadır (Kostakioti ve ark. 2013). Bunların oluşturduğu kolonilere ikincil koloniler denilmektedir. Biyofilm kolonizasyonu artarak büyüdükçe, kapsül oluşturmuş mikroorganizmaların EPS içinde sayısı da artmaktadır (Poulsen 1999).

Biyofilm tabakasının en küçük birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler ince biyofilm tabakalarında yatay, kalın biyofilm tabakalarında ise dikey planda düzenlenmektedir. Bu düzenlenmede en önemli etkenler, su akış hızı ve yüzey gibi çevre koşullarıdır. Suyun akış hızının artması EPS üretimi ile mikroorganizma sayısını

arttırmakta ve daha ince bir biyofilm tabakası oluşmasına yol açmaktadır (Percival ve ark. 1999).

Bakteriyel bir hücreden hücreye sinyalizasyon sistemi olan QS esas olarak mikrokloni oluşum aşamasında gerçekleşmektedir. Yüzeyde oluşan mikrokoloniler sebebi ile bakteri popülasyonu gittikçe çoğalmaktadır. QS sinyal sistemi bakteri popülasyonun belirli bir seviyeye geldiğinde çalışan bakteriyel iletişim sistemidir. Bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğu artıp belli bir seviyeye ulaşınca, popülasyonun yoğunluğunu algılayan ve hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinden oluşan QS sinyal sistemi devreye girmektedir. QS sonucu olarak, karşılık gelen genin ekspresyonunu düzenleyen ve EPS'leri salgılayan sinyal molekülleri salgılanmaktadır (Hammer ve Bassler, 2003). QS sinyal sistemi bakteri hücresinde spesifik genlerin ekspresyonunu etkileyerek olgun biyofilm yapısının oluşumunu desteklemektedir. Bu evrede biyofilm fenotipi ortaya çıkmaya başlamaktadır ve biyofilmdeki mikroorganizmalar dirençli bir yapı kazanmaktadırlar (Donabedian 2003).

QS, bakteri popülasyonun yoğunluğunu belirlemektedir ve bu sistemde bakteriler kendi çevrelerine dağılan küçük sinyal molekülleri üretip özel reseptör proteinleri ile konsantrasyona bağlı etkileşim sağlamaktadırlar. QS; biyofilmin virülans faktörleri, hareketliliği, koruma, biyofilm oluşumu, gen ifadeleri gibi birçok hayati proses ile ilgilidir (Bjarnsholt ve Givskov 2008). Biyolüminesans, sporülasyon, yeterlilik, antibiyotik üretimi, biyofilm oluşumu ve virülans faktörü salgılanması QS tarafından kontrol edilen işlemlerdir (Rutherford ve Bassler 2012). QS birçok patolojik bakteride virülans faktörlerinin üretimini kontrol etmektedir.

Normal QS sisteminin çalışması sinyal molekküllerinin katılımını gerektirir ve farklı bakteri türleri tarafından farklı sinyal molekülleri üretilmektedir. Bu moleküller, AHL (N-açil homoserin lakton) gibi Gram negatif bakterilerin salgıladığı farklı sinyal molekülleri, Gram pozitif bakteriler tarafından salgılanan AIP (autoinducing peptides) ve hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler tarafından salgılanan AI (autoinducers)-2'yi kapsamaktadır (Galloway ve ark. 2011; Rutherford ve Basler 2012).

QS sistemi popülasyonda senkronizasyonu teşvik edmektedir. Düzenleyici bileşenler ve moleküler mekanizmalardaki farklılıklara rağmen, bilinen tüm QS sistemleri üç temel ilkeye bağlıdır. Birincisi; topluluk üyeleri sinyal molekülleri olan AI (Autoinducer) üretmektedirler. Düşük hücre yoğunluğunda, AI'lar dağılır ve bu nedenle, tespit için gereken eşiğin altındaki konsantrasyonlarda bulunmaktadırlar. Yüksek hücre yoğunluğunda, AI'ların kümülatif üretimi, yerel bir yüksek konsantrasyona yol açarak tespit edilmesini ve karşılık almasını sağlamaktadır (Kaplan ve Greenberg 1985). İkincisi, AI'lar sitoplazmada veya zarda bulunan reseptörler tarafından tespit edilebilmektedir. Üçüncüsü, birlikte hareket etmek için gerekli genlerin ekspresyonunun aktive edilmesine ek olarak, Al üretimini aktive ederek AI'ların saptanması ile sonuçlanmaktadır (Novick ve ark. 1995; Seed ve Hughes 1995). Günümüzde QS'in önemi, bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından üretilerek ve hücreler arası sinyal ileterek, mikroorganizmanın gen sunumunu düzenleyen moleküller (AHL vs.) aracılığı ile biyofilm oluşumunun organize edilebileceğinin belirlenmesi yanı sıra biyofilmin patojenite ve çevreye uyum sağlamasında etkin olması sebebi ile daha da artmaktadır (Stickler ve ark. 1998; Dong ve Zhang 2005).

2.2.4 Olgun Biyofilm Oluşumu

Biyofilm olgunlaşma süreci, bakterilerin yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanmasından sonra başlamaktadır. Biyofilm olgunlaşması, bakteriyel biyofilmlerin olgunlaşmış ve organize bir yapıya dönüştüğü ve mikro koloninin maksimum boyutuna ulaşıp kalınlaştığı adımdır (Srey ve ark. 2013). Biyofilm büyümeye devam ederken, eDNA, biyofilm gerilme mukavemeti ve arttırılmış sertlik veren üç boyutlu bir mimari oluşturmak için EPS'ye bağlanmaktadır. Birçok tür, hücre yoğunluğuna bağlı bir şekilde fenotipik farklılaşmayı yönlendirmek için hücreler arasında QS sinyalini kullanmaktadır (Flemming ve ark. 2007).

Olgun biyofilm oluşumları düz tekli tabakalar, üç boyutlu yapılar veya düşük yüzey kaplama alanına sahip mantar veya lale benzeri düzenekler (topluluk) ile besin ve atık değişimi için çalışan su kanalları içermektedir (Karatan ve Watnick 2009; Jahid ve Ha 2012). Yapılan çalışmalarda bu yapılardaki bakterilerin, kompleks ekzopolisakkarit ile çevrili mikrokoloniler halinde yaşadıkları tespit edilmiştir. Bu evrede mikrokoloniler

büyüyerek kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya farklı yüksekliklerde kulelere dönüşmektedir (Chmielewski ve Frank 2003; Klausen ve ark. 2003). Bu yapılardaki mikrokolonilerin aralarında, besinlerin alınması ve metabolik atıkların uzaklaştırılması için ilkel bir dolaşım sistemi olarak çalışan su kanalları kullanılmaktadır (Kumar ve Anand 1998; Poulsen 1999). Gerçekleşen difüzyonun belli limitleri olması sebebi ile olgun biyofilm yapılarında bulunan alt katmanlarda besin ve oksijen alışverişi azdır. Besin ve oksijen alışverişinin azlığı alt katmanda bulunan bakterilerin metabolizma hızını düşürmektedir. Bu sebeple hücre dışı polisakkaritlerin üretimini azalmaktadır ve mikrobiyal hücreler alt tabakalardan üst tabakalara doğru göç etmeye başlamaktadır. Biyofilm yapısında mikrokolonilerin bu göç eğilimi, mikroskobik mantar formuna benzer yapılar oluşmasına yol açmaktadır (Klausen ve ark. 2003).

Olgun biyofilmin mikrobiyal bileşenleri ilk biyofilmden oldukça farklıdır. Biyofilm gelişimi sırasında bileşenlerde oransal bir değişim meydana gelmektedir. Bakteri agregasyonu çok karmaşık bir süreçtir. Olgun biyofilmler tipik olarak biyofilm boyunca birçok gözenekli tabaka ve su kanalı içermektedir ve bakterilere gerekli besinleri sağlamaktadırlar (Huang ve Gregory 2011).

Biyofilmlerin olgunlaşması iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada biyofilmin kalınlığı >10µm'dir ve planktonik hücrelere kıyasla protein ekspresyonunda büyük fark bulunmaktadır. İkinci aşamada kalınlık 100µm'ye kadar yükselmektedir, planktonik hücreler ve ilk olgunlaşma aşamasın protein ekspresyonu ile karşılaştırıldığında arada önemli bir fark bulunmaktadır. 100'den fazla protein sentezlenmektedir ve tüm proteinlerin %50 'si yukarı regüle edilmektedir (Sauer ve ark. 2002).

Küçük kolonilerin bağlanması, karakteristik üç boyutlu (3D) biyofilm yapısı ile olgun biyofilmlere dönüşmektedir. Hücreler ve taşıyıcılar arası ve hücreler arasındaki bağlanma esas olarak EPS'lere dayanmaktadır, böylece koloni taşıyıcı yüzeyden dökülmeyi önlemek için belirli bir mekanik basınca dayanabilmektedir. Hücre lizizi ve salgılanan hücre dışı DNA (eDNA), ilk biyofilm bağlanması için kritik öneme sahiptir ve salınan eDNA, biyofilm olgunlaşmasında önemli bir matris bileşeni olmaya devam etmektedir. QS ve yüzey aktif cisimlerinin düzenlenmesi biyofilm olgunlaşma süreçleri

için büyük önem taşımaktadır (Zhao ve ark. 2017). Olgun biyofilm üç tabakadan oluşmaktadır. İç tabaka canlı veya cansız gövdenin yüzeyini tamamen kaplamak yerine bir ağ yapısı oluşturan düzenleyici bir film oluşturmaktadır. Orta tabaka kompakt bir mikrobiyal bazal membrandır; en dış yüzey filmi ise planktonun yaşadığı yerdir. Antibakteriyel ajanlara karşı direnci arttıran patojenikliğe sahip olgun biyofilmdeki bakterilere temas etmek ve ortamdan uzaklaştırmak daha zordur ve biyofilmin koparak ayrılması genellikle *S. epidermidis* ve diğer gıda kaynaklı patojenler nedeniyle insanlarda enfeksiyonuna yol açmaktadır (Otto 2013). Ancak biyofilm olgunlaşması yıkıcı faktörlerden etkilenmektedir, çünkü enzimler biyofilm matrisi ile reaksiyona girmektedir ve biyofilmin nihayetinde serbest bakterilere dönüşmesine neden olmaktadır (Zhao ve ark. 2017). Ek olarak, biyofilm hücrelerinin kütleleri genellikle hücrelerden arındırılmış sınırlandırılmış iç boşluklar içermektedir. Bu nedenle, olgun biyofilm kolonileri karmaşık, oldukça farklılaşmış yapılardır. Biyofilm kolonisinde pH, oksijen konsantrasyonu, besin mevcudiyeti ve hücre yoğunluğu bakımından farklılık gösteren çok sayıda mikro ortam mevcuttur. Bu durum, koloninin farklı bölgelerinde bulunan hücreler arasında metabolik ve üreme aktivitesinde büyük bir heterojenite ile sonuçlanmaktadır. Koloninin iç kısmında bulunan metabolik olarak inaktif hücreler, aktif olarak büyüyen hücreleri hedefleyen antimikrobiyal ajanların etkilerine karşı dirençli oluşturmaktadır (Fux ve ark. 2004).

2.2.5 Olgun Biyofilm Hücrelerinin Göçü (Koparak Ayrılması)

Biyofilm oluşumunun beşinci ve son aşaması olan kopma veya ayrılma evresinde bakteriler biyofilmden koparak ortama dağılmaktadır. Kopma olayı dış faktörler kaynaklı gerçekleşebilmektedir ya da biyofilm oluşum prosesi aşaması olarak tek veya çoklu hücrelerin ayrılması şeklinde meydana gelmektedir (Poulsen 1999). Biyofilm oluşumu ve olgunlaşması sonrasında biyofilmde bulunan bakteri hücrelerinde yapılan genetik düzenlemeler sonucunda flagellalar sentezlenmektedir. Böylece hareket etmeye başlayan bakteri hücresi ve biyofilm üst tabakasından kopan planktonik hücreler yeni yüzeylere gitmektedirler. Bu yeni odak arayışı biyofilmin yayılımına ve yerel enfeksiyonların sistemik hâle geçişine sebep olmaktadır (Vlassova ve ark. 2011; Marcinkiewicz ve ark. 2013). Biyofilmden koparak yayılan hücreler, planktonik formda olsalar da ayrıldıkları topluluğun direnç özelliklerini taşımaktadır (Fraud ve ark. 2007).

Bakteriyel biyofilm dağılımı; hücrelerin biyofilm kolonisinden ayrılması, hücrelerin yeni bir yere taşınması ve hücrelerin yeni konumdaki bir substrata bağlanması şeklinde üç aşamaya ayrılmaktadır. Bir soğutma kulesinde büyüyen bir *Legionella spp*. biyofilminden ayrılan hücreler, hava yoluyla taşınan su damlacıkları yoluyla duyarlı bir konağın akciğerlerine taşınarak alveolar makrofajlara yapışıp enfeksiyonu başlatmaktadır (Kaplan 2010).

Ortamda besin maddelerinin azalması ya da bitmesi hücresel ayrılmaların önemli nedenlerinden biri olarak ifade edilmektedir (O'Toole ve Kaplan 2000). EPS veya yüzey bağlantısı oluşturan proteinlerin ortaya çıkması, akış kuvveti artışı, enzimatik bozulmaları benzeri hücre içerisinde görülen olaylar biyofilmden hücrelerin koparak ayrılmasında önemli faktörlerdir (Watnick ve Kolter 2000). Bu planktonik hücreler klinik veya kamusal ortamlarda hem enfeksiyonun hem de kontaminasyonun kaynağı olarak kabul edilmektedir. Ayrılma genellikle QS sinyalleri ile besin seviyelerinin azalmasının bildirilmesi veya biyofilm kümelerinin fiziksel etki nedeniyle kesilmesi sebebi ile gerçekleşmektedir (Donlan 2002).

Bakterilerin hayatta kalmasını ve yayılmasını sağlamak için bazı hücrelerin mevcut topluluktan dağıldığı biyofilm oluşum prosesinin son aşaması olan biyofilm dağılım mekanizmaları aktif ve pasif dağılma şeklinde iki geniş kategoriye ayrılmaktadır. Aktif dağılma mekanizmasında, bakteriler biyofilm matrisini parçalamak ve daha sonra yeni yerlere geçebilecek hücrelerin salınmasına izin vermek için topluluk ve çevresel işaretlere tepki vermektedir. Aktif dağılımda bakteriler dağılma mekanizmasını kendileri başlatmaktadır (Kaplan 2010). Aktif dağılma, sıcaklık değişimi, açlık, oksijen eksikliği ve metabolit birikimi gibi çevresel koşullardaki değişikliklerle tetiklenmektedir. Aktif dağılmada, flagella sentezi veya kemotaksis gibi hücre motilitesinde ve dispersin salgılanması gibi EPS degradasyonunda yer alan genler, yukarı regüle edilirken, polisakkarit sentezi gibi EPS üretimi ve fimbria sentezi gibi bağlanmadaki genler aşağı regüle edilmektedir (McDougald 2012). Bununla birlikte, pasif modda dağılma, dış organizma etkileşimi, besin mevcudiyeti ve çevredeki sıvının hareketi veya aşınma gibi çevresel kuvvetlerin bir sonucudur ve biyofilmin bir

kısmını mekanik bozulma yoluyla veya kuvvetle kaymasını veya erozyonu ile yerinden oynatmaktadır (Kaplan 2010).

Güç ve sıklığa göre ise olgun biyofilm hücrelerinin göçünün üç ana mekanizması aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir (Stoodley ve ark. 2002):

- Erozyon, biyofilm oluşumu sırasında düşük seviyelerde bir biyofilmden tekli hücrelerin veya küçük hücre kümelerinin sürekli koparak salımını ifade etmektedir.
- Düşme-Dökülme: ani ve büyük biyofilm kaybıdır. Bu işlem, besin ve oksijenin tükenmesi sonucu en son aşamalarda gerçekleşmektedir.
- Aşınma: ara sıvıdaki (bulk fluid) parçacıkların biyofilm ile çarpışmasıdır. Biyofilm kolonisi içinde oluşan içi boş oyuklardan çok sayıda tekli hücrenin veya küçük hücre kümelerinin hızlı salımını ifade etmektedir (Boles ve ark. 2005; Ma ve ark. 2009).

Erozyon ve dökülme şeklindeki kopmalar hem aktif hem de pasif dağılım mekanizmasında gerçekleşmektedir. Aşınma sadece aktif dağılım mekanizması olarak gerçekleşmektedir. Tüm bakteriler tarafından tek bir biyofilm dispersiyon mekanizması kullanılmamaktadır (Kaplan 2010). Biyofilm koparak dağılım aşaması biyolojik dağılım, bakteriyel hayatta kalma ve hastalık bulaşmasına katkıda bulunan biyofilm yaşam döngüsünün önemli bir aşamasıdır. Biyofilm gelişiminin diğer aşamaları gibi, olgun biyofilmin göçü çok sayıda çevresel sinyal, sinyal iletim yolu ve efektör içeren karmaşık bir süreç olmaktadır (Karatan ve Watnick 2009). Koparak yayılma, biyofilmin serbest bırakılan bakteri hücrelerini, biyofilm döngüsünü başka bir yerde gerçekleştirmek üzere çevreye geri gönderen bir rezervuar olarak hareket etmesine izin vererek bakteriyel kontaminant ve gıda maddelerinin bozulmasını kolaylaştırmaktadır (Kaplan 2010).

2.3 Biyofilm Matris Bileşenlerini Oluşturan EPS

Biyofilmler, matris adı verilen hücre dışı polimerik bir maddeye (EPS) gömülü birbiri, yüzey ve matris ile etkileşimli hücrelerden oluşan karmaşık mikrobiyal topluluklardır (Yang ve ark. 2012). Biyofilm oluşumunun, belirli fazlar ile bu fazlarla ilişkili metabolik prosesleri, tanımlanmış yapıları ve oluşumu etkileyen değişkenleri içeren kademeli bir proses olduğu genellikle tüm araştırmacılar tarafından kabul edilmiştir. Mikrobiyal biofilmler bir dereceye kadar yüksek oranda geniş bir ağa sahip sulu EPS'nin üretilmesiyle karakterize edilmektedir (Abee ve ark. 2011). Hücre dışı polimerik madde biyosentezi, polisakkaritlerin intraselüler olarak sentezi, karbon substratının asimilasyonu ve üretilen maddelerin hücre dışına verilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Finore ve ark. 2014).

Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, kendi ürettiği ve yakın çevrelerini oluşturan EPS'den oluşan bir sulu matrisde yaşamaktadır. EPS'ler esas olarak polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipitlerden oluşup; biyofilmlerin mekanik stabilitesi sağlayan, yüzeylere yapışmalarına aracılık eden, biyofilm hücrelelerini birbirine bağlayan ve geçici olarak immobilize eden, yapışkan üç boyutlu polimer ağı oluşturmaktadır. Ayrıca, biyofilm matrisi, hücre dışı enzimleri hücrelere yakın tutarak harici sindirim sistemi gibi davranıp, çözünmüş, koloidal ve katı biyopolimerleri metabolize etmelerini sağlamaktadır (Flemming ve Wingender 2010).

Biyofilmlerin en çok kullanılan yapısal özelliklerinden biri, Gram pozitif veya Gram negatif bakteri, proteinler, fosfolipidler, teikoik ve nükleik asitler ve az insidansla mineral kristaller ile silt parçacıkları miktarına göre matris içindeki miktarı değişen glikoz, fruktoz, mannoz, galaktoz ile piruvat bazlı homo ve hetero polisakkaritler içerebilen EPS matrisidir (Kumar ve Anand 1998; Shi ve Zhu 2009).

Biyofilm esas olarak %90 matris ve %10 mikroorganizmadan oluşmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010). Sesil hücreler bu matrise gömülü, büyüme oranları ve gen ekspresyonları ile ilgili olarak planktonik, serbest yaşayan muadillerinden farklıdır

(Donlan ve Costerton 2002; Lazar 2011). EPS matrisin %97'si, besinleri, metabolitleri ve hücre parçalama ürünlerini absorbe eden sudan geri kalan %3'ü matrisin anahtar bileşenleri olan proteinler ve polisakkaritler, biyofilm yapısının oluşmasında rol oynayan ekstraselülar DNA (eDNA), RNA, peptidoglikan, lipitler, surfektanlar, Ca^{2+} ve benzeri iyonlar, glikolipitler, fosfolipidler ve mebran keseciklerinden oluşmaktadır (Karatan ve Watnick, 2009; Sutherland 2001; Whitchurch ve ark. 2002). Ayrıca bazı Gram negatif bakterilerin, ör. *S. typhimurium* ve *E. coli,* EPS bileşeni olarak selüloz üretmektedir (Branda ve ark. 2005).

EPS matrisin bileşimi bakteriyel türlere veya aynı türün suşları arasında da değişmektedir (Branda ve ark. 2015). Üç boyutlu biyofilm yapısında iskeleti EPS matris oluşturmaktadır. Sulu bir tabiata sahip olan matris, temel besin ve minerallerin tutularak konsantre edildiği bir sistem oluşturmaktadır. Matris, biyofilmlerdeki bakterileri çevresel tehditlere, biyositlere, antikorlara, sürfaktanlara ve beyaz kan hücrelerine karşı korumaktadır (Starkey ve ark. 2004). EPS matrisin bileşimi, sıcaklık, besin kaynakları ve oksijen konsantrasyonu dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere bakteriyel bir biyofilmin büyüdüğü çevresel koşullara tabidir. EPS, hidrofibik ve hidrofilik yapıda olmaktadır. Genellikle anyonik tip üronik asitler (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asitler) ve ketal bağlı piruvatlar kalsiyum ve magnezyum birleşiminin arttırılması yoluyla yüzeye bağlanma kuvvetini arttırmaktadır. EPS Gram pozitif bakteriler bulunduğunda katyoniktir, ana yapısı protein ve teikoik asitlerden oluşmaktadır (Sutherland 2001).

2.3.1 Polisakkaritler

Polisakkaritler, EPS matrisinin ana fraksiyonunu oluşturmaktadır (Boretska ve ark. 2013). EPS'de bulunan yüksek ağırlıklı moleküller olan polisakkaritleri, hücre dışına sentezlemektedir. Hücre duvarına bağlı olan ekzopolisakkaritler, kapsüler ekzopolisakkarit; ortamda serbest halde bulunan ekzopolisakkaritler, mukoz ekzopolisakkarit olarak ayrılmaktadır (Nwodo ve ark. 2012). Bakteri tarafından üretilen ve hücre dışına salgılanan hücrenin dışındaki polisakkarit içeren katmanlar toplu olarak

glikokaliks olarak tanımlanmaktadır, ancak katmanlar katı olduğunda ve partikülleri hariç tutan sıkı bir matriste düzenlendiğinde kapsül terimi kullanılmaktadır. Katmanlar parçacıkların girişini engellemeyerek, daha kolay deforme olup ayrılırsa, mukus (slime) terimi kullanılmaktadır (Van Houdt ve Michiels 2010). Biyofilmin büyük bir parçasını oluşturan bu ekzopolisakkaritler biyofilmin savunmasında önemli rol oynamaktadırlar (Davey ve O'toole 2000).

Ekzopolisakkaritler ekstra/intrasellüler sentezlenip hücre dışına taşınmaktadırlar. Diğer karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipidlerin tutunabilmeleri için iskelet görevi gören ekzopolisakkaritler, elektron mikroskobu altında büyük, uzun ve esnek ağlar şeklinde, hücre yüzeyine bağlı uzun zincirlerin dallanması veya lineer görüntüde gözlemlenmiştir. Bileşenleri, yapı ve özelliklerine bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin bir biyofilmi diğerinden farklı kılabilmektedir (Sintim ve ark. 2015). Doğrusal veya dallı olabilen ekzopolisakkarit zincirleri genel olarak monosakkaritler ve karbonhidrat olmayan asetat, piruvat, süksinat ve fosfat gibi bazı ikame edici maddelerden oluşmaktadır (Andersson 2009).

Biyofilm matrisinde en bilinen ekzopolisakkaritler, poli-N-asetil glukozamin (PNAG), aljinat ve selülozdur. Polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) veya ilgili poli-N-asetil glukozamin (PNAG) polimeri, bazı bakteri türlerinin bakteriyel yapışması ve biyofilm oluşumu için gereklidir (Lembre ve ark. 2012). PNAG, bakteri hücrelerinin çevresinde, hücre-hücre etkileşimlerinde de rol oynayan koruyucu bir matris oluşturmaktadır (Mack ve ark. 1996). PNAG ayrıca eDNA ile etkileşime girererek biyofilm matris yapısını güçlendirebilmektedir (İzano ve ark. 2008). *E. coli, S. epidermidis, S. aureus, Yersinia pestis, Actinobacillus spp., Aggregatibacter aktinomisetemcomitans* ve *Bordetella spp.*'in dahil olduğu çeşitli bakteri türleri, biyofilm matrislerini oluşturmak için bu ekzopolisakkariti kullanmaktadır (Karatan ve Watnick 2009).

En çok incelenen ekzopolisakkaritlerden biri olan aljinat sadece üronik asitlerden oluşmaktadır. Aljinat, 1,4-bağlı β-d-mannuronat ve a-l-guluronatın 1-4 bağlı

üronik asit kalıntılarından oluşan yüksek molekül ağırlıklı, dallanmamış bir heteropolimerdir. Aljinat, nispeten yüksek moleküler kütleye (104-106 gr/ml) sahip bir ekzopolisakkarittir. Aljinatın aşırı üretimi mukoid suşların karakteristiğidir ve genellikle σ faktörü Algu negatif regülatör (MucA) kodlayan gendeki mutasyonların bir sonucudur. Aljinat, biyofilm oluşumunun başlangıcında mikrokolonilerin kurulmasında rol oynamaktadır, aynı zamanda olgun biyofilmlerin mekanik stabilitesinden de sorumludur (Flemming ve Windenger 2010).

Biyofilm matrislerinde yaygın olarak bulunan bir başka ekzopolisakkarit, (1-4) β-bağlı glikozun doğrusal bir polimeri olan selülozdur. Selüloz, bazı *E. coli* suşlarının ve bazı *Salmonella, Citrobacter, Enterobacter* ve *Pseudomonas* türlerinin yanı sıra *Agrobacterium tumefaciens*'in biyofilm matrislerinin önemli bir bileşenidir (Karatan ve Watnick 2009). *Salmonella* ve *E. coli*, hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olarak selüloz üretmektedir (Solano ve ark. 2002). Selüloz 50 ºC ve üzeri sıcakıklarda ve 10 °C ve altı sıcaklıklarda bir jel oluşturmaktadır. Selülozun jel yapısı, bu polimeri üreten bakteriyel türlerin oluşturduğu biyofilmlerin mekanik özelliklerini açıklayabileceği belirtilmiştir (Lembre ve ark. 2012).

2.3.2 Proteinler

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan hücre dışı proteinler, hücre yüzeyi adezinleri, flagella ve pili gibi hücre uzantılarının protein alt birimleri ve dış zar veziküllerinin proteinleri, biyofilm matrisinin proteinli bileşenleri arasında yer almaktadır (Fong ve Yıldız 2015). EPS matrisinin kimyasal bileşiminin çok heterojen olduğu bildirilmektedir. Ana EPS bileşenleri karbonhidrat ve protein genellikle 0,2-5 arasında protein/karbonhidrat ağırlık oranına sahiptir (Goodwin ve Forster 1985). Hücre dışına salgılanan 10 ve 200 kDa arasında moleküler kütleli proteinler %40 - %60 arasında hidrofobik amino asit içermektedir (Lory 1992).

Biyofilmin protein ekspresyonu biyofilmlerin olgunlaşma aşamalarına göre ve planktonik hücrelere göre değişmektedir. İlk aşamada biyofilmin kalınlığı >10μm'dir ve protein ekspresyonunda planktonik hücrelere kıyasla derin bir fark vardır. İkinci

aşamada kalınlık 100 μm'ye ulaşır ve protein ekspresyonunda planktonik hücrelere ve ilk olgunlaşma aşamasına kıyasla önemli bir fark vardır. 100'den fazla protein sentezlenerek tüm proteinlerin %50'si yukarı regüle edilmektedir (Sauer ve ark. 2002).

Biyofilm matris proteinleri, biyofilm oluşumu ve çözünmesinde çeşitli roller oynamaktadır. Hücrelerin yüzeylere tutunması, ekzopolisakkarit ve nükleik asit bileşenleri ile etkileşimler yoluyla biyofilm matrisinin stabilize edilmesinde, üç boyutlu biyofilm yapılarının geliştirilmesinde ve biyofilm matrisinin polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerin enzimatik bozulması yoluyla çözülmesinde rol oynamaktadır (Fong ve Yıldız 2015). Polisakkaritlere ve hücre yüzeyine bağlı proteinler biyofilm oluşumu ve stabilize edilmesinde görev almaktadır (Frølund ve ark. 1996).

Proteinler, biyofilm yapısı ve fonksiyonundaki önemlerinden dolayı giderek daha fazla tanınmaktadır. Birçok organizma için biyofilmlerin yapı ve direnç özellikleri proteaz uygulaması ile ortadan kaldırılabilmektedir (Wu ve ark. 2014). Biyofilm yapısına ve stabilitesine katkıda bulunan matris proteinlerinin yokluğunun biyofilm oluşumu ve stabilitesinin azalmasına ve biyofilm mimarilerinin değişmesine neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Borlee ve ark. 2010).

2.3.3 Lipidler ve Sürfektanlar

Lipidler ve sürfektanlar biyofilm matriks bileşenidir (Conrad ve ark. 2003). Lipidler fungal biyofilmleri koruyan hücre dışı matrisin (EPS matris) önemli bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. Bakteriler üzerine yapılan çeşitli çalışmalara göre, lipidler hücrelerin yüzeylere bağlanmasında ve biyofilm oluşumunda belirleyici rol almaktadır (Rowlett ve ark. 2017). Bunun en önemli sebebi lipidlerin biyofilmdeki hücrelerde, fosfolipitler ve moleküler türlerinin dağılımı planktonik hücrelerden farklı olmasıdır (Mukherjee ve ark. 2003). Plazma zarına yapısal bütünlük sağlamada, büyüme ve patogenezin modüle edilmesinde lipidlerin rolü vardır (Toulmay ve Schneiter 2007). EPS matriste bulunan lipidler, biyofilm yapısının yüzeye tutunmasına destek sağlar ve aynı zamanda, biyokimyasal özellikleri ile biyosidal ajanların etkinliğini düşürerek bu yapının korunmasını sağlamaktadır (Conrad ve ark. 2003). Son yıllarda plazma

membranı ve EPS matris üzerinde bulunan lipidlerin biyofilmin mimari stabilitesi için gerekli olabileceğini göstren önemli kanıtlar bulunmuştur (Rella ve ark. 2016). Sfingolipid-ergosterol moleküllerinden oluşan lipid mikro bölgelerinin hücre zarının fiziksel özelliklerini etkilediği ve böylece virülansa katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca membran lipid kompozisyonu, hücre boyutu ve hücre şeklinin önemli bir belirleyicisidir. Bakteri hücrelerinde yüzey yapışmasını ve biyofilm oluşumunu sağlayan temel morfolojik parametreler olarak kabul edilmektedir (Rowlett ve ark. 2017). Biyofilm EPS matris komponenti lipopolisakkaritler ve lipidler, matriste bulunan lipaz ve esteraz enzimleri vasıtasıyla monomerlerine parçalanmaktadır (Wingender ve Jaeger 2002).

Bir diğer EPS elemanı olan sürfaktanlar ise hidrofobik bileşiklerdir. Biyosürfektanların farklı özelliklere sahip çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretildiğini belirtmektedir (Ron ve Rosenberg 2003). Biyofilm içindeki bu bakteriler, aynı zamanda arayüzey özelliklerini de kontrol eden sürfaktanları birbirleriyle iletişim kurmak için üretmektedir (Daniels ve ark. 2006). Hücreler, polimer, çapraz bağlantılar ve sürfektanların üretimi ve kümelenmesi heterojen ve dinamik bir yapıya yol açmaktadır (Wilking ve ark. 2011). Biyofilmlerdeki yüzey gerilimi gradyanları çok fazla araştırılmamakla birlikte, biyo-sürfektanların yüzey aktif doğasının, hareketlilik için fiziksel itici gücün temelini oluşturduğu geniş bir kabul görmektedir (Kinsinger ve ark. 2003).

Bir çeşit sürfektan olan ramnolipidlerin biyofilmde yüzeye tutunmada üst üste sıralanan bakteri hücrelerinin besin, oksijen gibi temel ihtiyaçlara olan erişimlerinde rolü bulunmaktadır. Bakteri miktarı artışı ile en alt katmandaki hücrelerin temel ihtiyaçlar olan besin ve oksijen gibi maddelere ulaşması zorlaşmaktadır. Oluşan bu hücre yığını ayrıca alt katmandaki hücrelerin hareket etmesini kısıtlamaktadır. Ramnolipidler alt katman hücrelerin besin ve oksijen ihtiyaçları için kanal oluşturmak dışında dış yüzeyle olan irtibatlarını koparmadan hareketliliklerinin devamını sağlamaktadır. Ramnolipid içeren EPS matrise sahip bakterilere *Pseudomonas aeruginosa* örnek olarak verilebilmektedir (Davey ve ark. 2003).

2.3.4 Su

Hücre dışı matris su ve EPS'den oluşur. Biyofılm matrisindeki ana bileşen, %97'ye kadar olan sudur ve solvent olan suyun karakteristikleri, içinde çözünen bileşenler tarafından belirlenmektedir (Stoodley ve ark. 1999). Biyofilm matrisinin bileşimi, bakteri türüne ve biyofilm arayüzüne bağlı olarak oldukça değişkendir (Sutherland 2001). Su, mikrobiyal hücrelerin kapsülleri içine bağlanabilmektedir veya viskozite gibi fiziksel özellikleri, içinde çözünmüş maddeler tarafından belirlenen bir solvent olarak bulunmaktadır. Biyofilm matrisi içindeki su bağlama ve hareketlilik, biyofilm içinde meydana gelen difüzyon süreçlerinin ayrılmaz bir parçasıdır; bu nedenle su biyofilmin ince yapısı içinde organize edilmektedir (Schmitt ve Flemming 1999).

EPS matris yüksek oranda suludur, çünkü hidrojen bağlaması ile yapısına büyük miktarlarda su eklemektedir (Sutherland 2001). Biyofilmde bakterilerin canlılığı için uygun pH ve nem sağlayan su, solvent olarak içinde çözünen inorganik ve organik bileşenlerin yanısıra diğer komponentlere ortam sağlamaktadır. EPS matrisi ve içindeki su daha yavaş kuruyan yüksek oranda nemli bir ortam sağlamaktadır ve biyofilm hücrelerini su potansiyeli ve kurumadaki dalgalanmalara karşı korumaktadır (Potts 1994).

EPS'ler biyofilmlerin mimari formunu oluşumunu desteklemektedir ve 3 boyutlu yapılarını stabilize etmektedir. Biyofilmlere, genellikle bakterilerin su, besin, enzim ve sinyal alışverişi yapmalarına, potansiyel olarak toksik metabolitleri atmalarına ve gelişmiş metabolik iş birliği yapmalarına olanak tanıyan bir dolaşım sistemi görevi gören kanallar tarafından nüfuz edilmektedir (Costerton ve ark. 1995). Biyofilmlerin ana bileşenler tipik olarak su ve bakteri hücreleridir, bunu matrisin EPS'leri takip eder; konakçıdan gelebilecek antibiyotik, savunma maddeler veya diğer önemli bileşiklerin difüzyonuna karşı fiziksel bariyer ve UV radyasyonu, pH değişiklikleri, ozmotik stres ve kuruma gibi çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlamaktadır (Bogino ve ark. 2013). Biyofilm içindeki EPS matrisi ile kaplanan bakteriyel hücreler, su kanalları ile diğer mikrokolonilerden ayrılmaktadır. Bu kanallarında akan su vasıtası ile besin maddelerinin, oksijenin ve hatta antimikrobiyal ajanların difüzyonu sağlanmaktadır (Donlan 2002).

2.3.5 Hücre dışı DNA (eDNA)

Hücre dışı DNA'nın (eDNA) biyofilm oluşumundaki ayrılmaz rolü ilk olarak P. aeruginosa'da tanımlanmıştır. Hücre dışı polisakkaritler biyofilm matrisinin ana yapısal bileşenleri olarak kabul edilmelerine rağmen, hücre dışı DNA biyofilm yapısının oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (Whitchurch ve ark. 2002). Günümüze kadar araştırmalarla, eDNA'nın biyofilm oluşturan Gram negatif ve Gram pozitif çoğu bakterinin ve diğer mikroorganizmaların matrisinde bulunduğu tespit edilmiştir (Steinberger ve Holden 2005; Okshevsky ve Meyer 2015). Biyofilm matrisi içinde bulunan eDNA'nın başlangıçta lize edilmiş hücrelerden kalan artık DNA olduğu düşünülmüştür (Flemming ve Windenger 2010). Ancak daha sonra eDNA'nın sadece lize edilmiş hücrelerden kalan DNA parçaları olmadığı gibi, biyofilm oluşumunda görev alan önemli bir matris bileşeni olarak, biyofilmdeki mikrobiyel hücrelerden denetimli şekilde hücre dışına salgılandığı tespit edilmiştir (Hamilton ve ark. 2005). eDNA'nın miktarı, lokalizasyonu ve kökeni bakteri türüne bağlı olarak değişmektedir (Böckelmann ve ark. 2006).

2.4. Gıda Endüstrisinde Biofilm Oluşumu ve Etkileri (Biyofilm Oluşturan Bakteriler)

Biyofilmler, gıda, gıda işleme yüzey ve ekipmanları, su boru hatları, endüstriyel borular, havalandırma, tıbbi cihazlar, patolojik insan doku ve organları gibi nemli yüzeylerde yaygın olarak bulunmaktadır (Hall Stoodley ve Stoodley 2005). Gıda kaynaklı patojenler gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturabilir ve bu nedenle gıda güvenliği açısından büyük risk oluşturmaktadır (Kumar ve Anand 1998; Poulsen 1999; Srey ve ark. 2013). Gıdalar veya fabrika ekipmanları üzerinde oluşan bakteriyel biyofilmlerle ilişkili gıda kaynaklı hastalıklar, intoksikasyon veya enfeksiyonlar yoluyla ortaya çıkabilmektedir. Bunun dışında biyofilmler, mekanik parçaların çalışmasını engellemesi, ısı transferi azalmasına sebep olarak daha fazla enerji tüketimine sebep olması ve biyofilmlerin bulunduğu yüzeylerin korozyon oranını arttırarak (10-1000 kat daha hızlı korozyona ve poroziteye neden olur) malzeme kaybı oluşturması açısından da önemlidir.

Biyofilmler boru ve tüplerde kütle ve ısı transferini sınırlamaktadır. Gıda ürünlerinin reddedilmesine ya da geri çağırmaya sebep olması, gıda ürünlerinin raf ömrünün kısalması, ürün bozulmasının artması nedeniyle biyofilmler mali kayıplar oluşturmaktadır (Kretli 2015). Gıdaya temas eden yüzeylerde oluşan biyofilmler nihai ürünün kontaminasyonunun ana nedenidir ayrıca çapraz bulaşmalara da sebep olmaktadır (Téllez 2010).

Biyofilmler, gıda sektöründe biracılık, deniz mahsulleri işleme, süt işleme, kanatlı ve et işleme, yarı mamul ve mamül sebze meyve işleme gibi pek çok alanda sorun oluşturmaktadır (Srey ve ark. 2013). Biyofilm gelişimi için ana yerler fabrika tipine bağlı olmakla birlikte su, süt ve diğer sıvı boru hatları, pastörizatör plakaları, ters osmoz membranları, masalar, çalışan eldivenleri, hayvan karkasları, temas yüzeyleri, hammaddeler ve katkı maddeleri için depolama siloları, dağıtım tüp, ambalaj malzemesi vb. alanları kapsamaktadır (Camargo ve ark. 2017). Biyofilmler genellikle boru malzemesindeki çatlaklarda, köşelerde, contalarda, derzlerde ve yarıklarda veya boru sistemindeki çıkıntılarda bulunmaktadır (Poulsen 1999).

Biyofilm oluşturma, gıda endüstrisi ortamındaki mikrobiyal hücrelere kuruma gibi etkenlere karşı fiziksel direnç, boru hatlarındaki sıvı akışlarına karşı mekanik direnç ve endüstride kullanılan kimyasallara, antimikrobiyallere ve dezenfektanlara kimyasal koruma gibi birçok avantaj sağlamaktadır (Galie ve ark. 2018). Gıda üretim alanlarındaki gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde tek bir türden ya da birden fazla türde mikroorganizma tarafından oluşturulmuş, biyofilmler gözlemlenmiştir. Gıda üretim alanlarında oluşan biyofilmlerin karışık türler içermesi durumunda sanitizer ve dezenfektanlara karşı daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (Jahid ve Ha 2014).

Gıda işletmelerinde özellikle önemli olan biyofilm oluşturan patojenler gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan paslanmaz çelik, polietilen, ahşap, cam, polipropilen ve kauçuk gibi farklı yapay yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturmaktadır (Abdallah ve ark. 2014; Colagiorgi ve ark. 2017) ve bu yüzeylerdeki biyofilmler dezenfektanlara karşı direnç göstermektedirler (Jahid ve Ha 2012; Srey ve ark. 2013).

Bu nedenle gıda ile temas ve işleme yüzeylerinin tasarımında malzeme seçimi büyük önem taşımaktadır. Bu malzemeler hücrelerin belirli bir yüzeye yapışabilme kabiliyetini etkilediğinden, pürüzlülük, temizlenebilirlik, dezenfekte edilebilirlik, ıslanabilirlik (hidrofobiklik ile belirlenir) ile aşınma ve yıpranma durumu gibi özellikler, aynı zamanda malzemenin hijyen durumunu belirlediğinden, göz önünde bulundurularak malzeme belirlenmelidir (Van Houdt ve Michiels 2010).

Gıda işletmelerinde biyofilm gelişimini etkileyen faktörler arasında yüzey ve arayüz özellikleri, besin ulaşılabilirliği, mikrobiyal topluluğun kompozisyonu, hidrodinamik özellikler, türler arası etkileşim ve hücresel taşıma gibi özellikler bulunmaktadır (Chmielewski ve Frank 2003). Biyofilmler oluştuğunda, kimyasallara ve çevresel değişikliklere duyarlılık büyük oranda azalmaktadır ve tamamen ortamdan uzaklaştırılamamaktadır. Biyofilmler EPS matris tarafından iyi korundukları için, yüksek antimikrobiyal dozajlarla dahi ortamdan uzaklaştırılamamaktadır (Zhao ve ark. 2017). Ortamdaki besin konsantrasyonu ve kayma koşulları gibi dış faktörler bağlanma derecesini ve biyofilm oluşumunu etkilemede önemli rol oynayabilmektedirler. Gıda ile temas eden yüzeyleri oluşturan paslanmaz çelik, cam ve kauçuk gibi materyallerin bağlanma seviyesi ve biyofilm oluşumu düzeyi üzerinde etkisi olduğu ileri sürülmektedir (Srey ve ark. 2013). Kim ve ark. (2016), polipropilen yüzeylerde biyofilm oluşumunun, paslanmaz çelik gibi hidrofilik yüzeylere kıyasla daha etkin olduğunu belirtmiştir.

Gıda işletmelerinde biyofilm oluşturan bakteriler

Gıda işletmelerinde ürünlerinin bozulmasına, intoksikasyon ve enfeksiyon oluşmasına sebep olan biyofilmler, çoğunlukla Enterokok türleri, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella* türleri, *Campylobacter jejun*i, *Pseudomonas aeruginosa S. aureus* ve *Bacillus cereus* gibi bakteriler tarafından üretilmektedir (Srey ve ark. 2013). Biyofilmler, bu tür bakterilerin gıda işleme ortamlarında kalıcılığından ve işlenmiş gıdaların kontaminasyonundan sorumludur (Coughlan ve ark. 2016).

Biyofilmlerde bulunan Enterobacteriaceae familyası ile *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. ve laktik asit bakterileri gibi diğer bazı spesifik bozulma organizmaları, et ve sebzelerde gerçekleşen bozulmalarda rol oynayan farklı enzimatik aktiviteleri koordine etmek için sinyal molekülleri üretmektedir. Ayrıca, farklı ticari balık ürünlerinde AHL'lerin QS sisteminde potansiyel rolleri bulunduğu tespit edilmiştir (Gram ve ark. 2002).

Taze balık işleme tesislerinde özellikle *L. monocytogenes, Aeromonas hydrophila, S. enterica* ve *Vibrio* spp. gibi patojen bakteriler biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilmin patojenite, metal yüzeylerin korozyonu, lipazların veya proteazların sekresyonuna bağlı organoleptik özelliklerin değiştirilmesi gibi etkileri, gıda sanayinde özellikle süt fabrikaları gibi alanlarda kritik öneme sahiptir. Santrifüjler, peynir tankları, pastörizatörler ve paketleme araçları gibi ekipmanlar farklı sıcaklıklarda, psikrotrofik *Pseudomonas* spp. ve termofilik *Geobacillus stearothermophilus* gibi farklı kolonize edici türler içeren biyofilmler için yüzey substratları görevi görmektedir (Mizan ve ark. 2015). Süt işleme tesislerinde, proses biyofilmleri olarak da adlandırılan biyofilmleri oluşturan önemli bakteriler, *Bacillus* türleri, termodurik veya termofilik özellikteki basiller ve *Streptokok* türleridir (Flint ve ark. 1997).

Tablo 2-2. Gıda işletmelerinde biyofilm oluşturan bakteriler

Biyofilm oluşturduğu alan-gıda	Biyofilm oluşturan bakteri
Süt sanayii	*Enterobacter*, *Pseudomonas* spp. *Listeria* spp., *Lactobacillus, Micrococcus, Streptococcus, Bacillus*
Balık ürünleri	*Vibrio* spp., *L. monocytogenes, Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Aeromonas*, *Pseudomonas* spp.
Et ürünleri	*L. monocytogenes, Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.
Kanatlı ürünleri	*Salmonella* spp, *Campylobacter* spp.
Sebze meyve ürünleri	*E. coli, L. monocytogenes, Salmonella enterica*
Hazır gıdalar	*L. monocytogenes, E. coli* O157:H7

Kaynak: Srey ve ark. 2013, Mizan ve ark. 2015

L. monocytogenes, biyofilm oluşumu için ideal olan soğuk ve nemli ortamlarda çoğalma yeteneğine sahip dayanıklı bir patojendir, çoklu tür biyofilmlerde hayatta kalabilmekte ve büyümektedir. Paslanmaz çelik, plastik ve polikarbonat yüzeyler ve diğer birçok gıda ile temas eden yüzey malzemelerine bağlanarak biyofilm oluşturabilmektedir. *Listeria*, gıda işletmelerinde özellikle kolay temizlenemeyen yüzeylerde, üretim ve paketleme ekipmanlarında giderler, yoğuşma suyu, depolama tankları ve el arabaları, taşıma bantları, zemin gibi yüzeylerden izole edilmiştir (Chmielewski ve Frank 2003). *L. monocytogenes*, gıda işletmelerinde birkaç ay, hatta birkaç yıla kadar biyoilm içinde hayatta kalabilmektedir ve yeniden kontaminasyon tehdidi oluşturmaktadır (Sofos ve Georgnaras 2010).

Salmonella, cansız yüzeylere yapışmayı kolaylaştıran ve mekanik kuvvetlere hücre direnci sağlayan bir hücre yüzeyi uzantısına (SEF-17 fimbria) sahiptir, ayrıca bakteriyel hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olarak hayatta kalması için gerekli olan selüloz üretmektedir (Tellez 2010). *Salmonella* spp.'lerinin yüzey ve hücre-hücre temaslarında yer alan ve topluluk davranışının ve konakçı kolonizasyonunun teşvik edilmesini sağlayan curli adı verilen proteinli hücre dışı lifleri bulunmaktadır. Serovarları arasındaki biyofilm oluşumu ile ilgili önemli farklılıklar nedeni ile gıda işleme ortamlarında en kalıcı olan biyofilmleri oluşturabilmektedirler (Vestby ve ark. 2009). *Salmonella* spp.'lerin plastik, çimento ve paslanmaz çelik dahil olmak üzere gıda işleme tesislerinde bulunan yüzeylere bağlanarak biyofilm oluşturduğunu göstermektedir.

E. coli gibi Gram negatif bakterilerde aktif hareketlilik, sıvı veya yarı sıvı ortamda hareket flagella ile sağlanmaktadır. Flagella, *E. coli*'nin yüzey boyunca yayılarak biyofilm oluşturmasını sağlamaktadır. *E. coli* biyofilmlerin oluşumunda yüzeye bağlanmayı başlatmak için flagella, pili ve membran proteinlerini kullanılmaktadır. Yüzeye bağlandıktan sonra flagellasını kaybederek EPS üretimini arttırmaktadır (Beloin ve ark. 2008). *E. coli*'nin tip I pilus ile ilintili bağlanması, flagellar motilite gerektirmektedir ancak curli aracılı bağlanma, hareketlilikten bağımsızdır (Lejeune 2003). Meyve ve sebzelerin yüzeyinde biyofilm oluşturabilmeketedirler. *E. coli* O157:H7'in, suya batırılmış ve bir hafta boyunca 4°C'de inkübe edilen marul yaprakları üzerinde kolonize olarak ve biyofilm oluşturabildiği tespit edilmiştir (Keskinen ve Annous 2008). *E. coli* biyofilmleri, kıvrımlara benzer kaba, kurutulmuş ve kırışmış morfoloji gösteren *Salmonella* biyofilmleri gibi uzun süreli dehidrasyona ve bakterisidal etkilerine karşı koruma için selüloz üretmektedir (Hung ve ark. 2013).

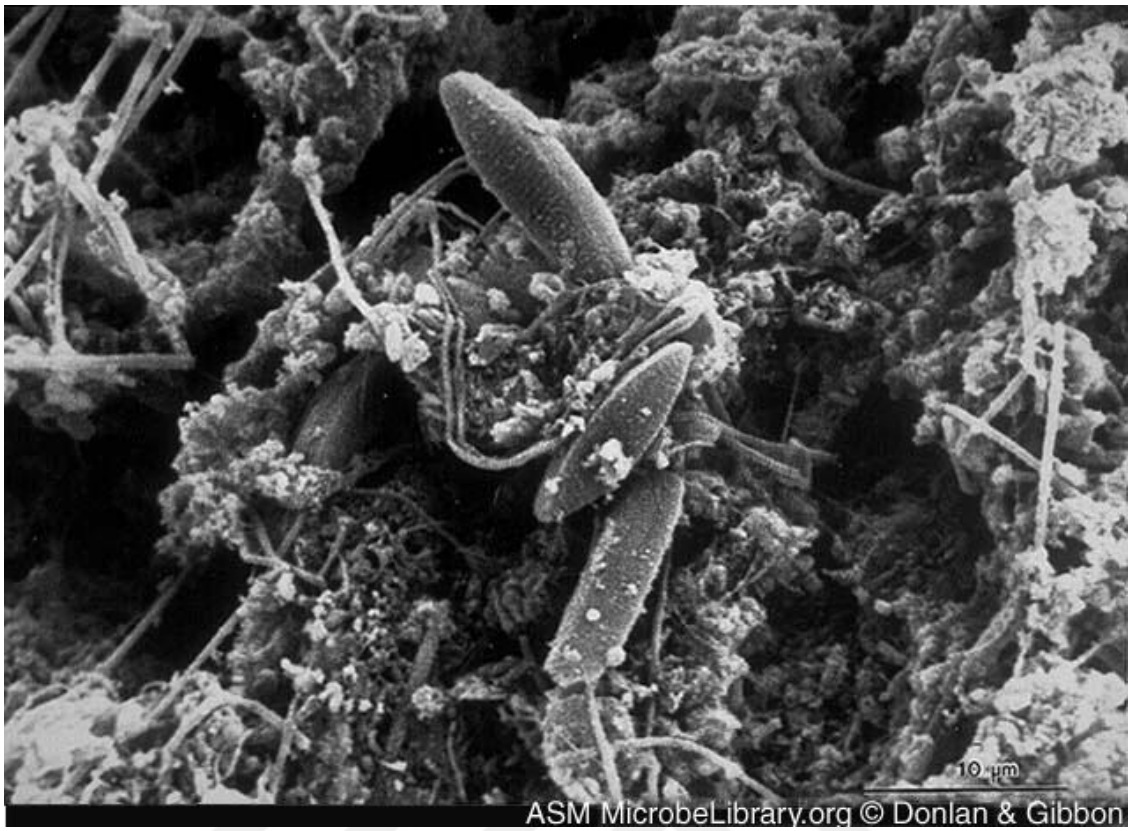
Gıda işletmelerinde bir diğer önemli biyofilm oluşturan bakteri olan *Staphylococcus* suşlarının polistiren ve paslanmaz çelik yüzeylerindeki biyofilm oluşturma yeteneklerinde büyük farklılıklar bulunmaktadır (Moretrove ark. 2003). *S. aureus* biyofilmlerinin gıda endüstrisinde kontaminasyonu dondurulmuş gıda ve hayvan

yemi benzeri hammaddeler, et mezbahası ve boru hattı gibi gıda üretim ekipman ve işleme ortamları ve ekipmanların işletme içindeki dolaşımı ana üç ana kaynaktan gerçekleşmektedir (Miao ve ark. 2019). *S. aureus*, PIA polisakkaritine bağımlı ve bağımsız olarak glikokaliks veya balçık tabakası içine gömülü çok katmanlı biyofilm üretebilmektedir (Archer ve ark. 2011).

Bacillus cereus biyofilmleri genellikle gıda işleme hatları boyunca diğer mikroorganizmalarla ilişkilidir. *Bacillus* spp. günümüzde süt ve süt ürünlerinin mikrobiyal bozulmasının ana nedeni olarak kabul edilmektedir (Majed ve ark. 2016). *Bacillus* spp. ısıl işleme karşı direnç göstermektedir ve süt vb. ürünler işlenirken boru ve bağlantı bölümlerinde kümelenme eğilimi bulunmaktadır (Jeong ve ark. 1994). *B. cereus*'un gıda üretim yüzeylerine ilk bağlanması, diğer bakteri türlerinin hızlı bir şekilde bağlanmasını kolaylaştırmak için ön koşullandırma etkisi oluşturarak bu bakterileri, su akışı, süt akıntıları veya diğer fiziksel mekanizmalarla uzaklaştırılmalarını engellemektedir (Marchand ve ark. 2012).

Campylobacter jejuni daha çok kanatlı hayvanlarda ve üretim alanlarında görülen termofilik ve mikroaerofilik bir patojendir. Biyofilmler içlerindeki mikroorganizmaları dış etkilerden korudukları için kanatlı işleme fabrikalarının su sistemlerindeki *C. jejuni* bulaşma kaynağı olduklarına inanılmaktadır (Trachoo 2003).

Pseudomonas spp. gıdalarda bozulmaya neden olan biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır. Bu organizmaların biyofilmleri genellikle drenajlar ve zeminler, meyve, sebze, et yüzeyleri gibi gıda işlemede ortamlarında oluşmaktadır (Chmielewsky ve Frank 2003). Ayrıca taze balık işleme ve muhafaza alanlarında *Pseudomonas* spp. Biyofilmleri bozulmalara neden olmaktadır (Bai ve Vittal 2014). Bu bakteri çok kalın EPS matris üretir ve biyofilm içindeki diğer türler ile yaşayabilmektedir (Chmielewsky ve Frank 2003 Flagella, *P. aeruginosa*'nın yüzme ve kaynama hareketliliğine aracılık etmektedir (Doğan ve Boor 2003). Ayrıca adezin gibi davranarak ilk hücre-yüzey etkileşimlerinde kritik rol oynamaktadır (O'Toole ve Kolter 1998).

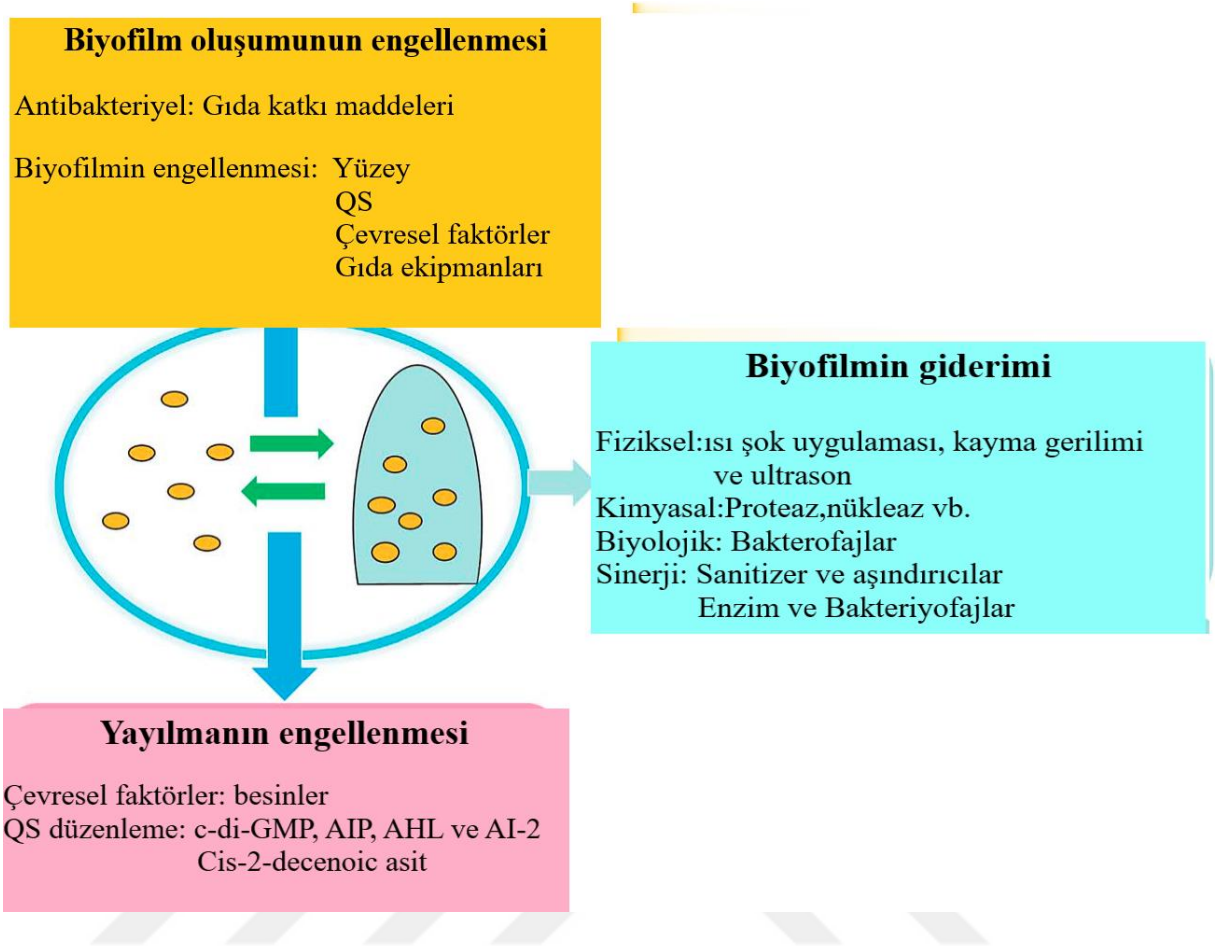


Şekil 2-4 Endüstriyel su sisteminde çelik yüzeyde 8 haftalık biyofilm (Donlan 2002).

2.5. Biofilm oluşumunun engellenmesi ve oluşan biofilmlerin uzaklaştırılması

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak kendilerini bulundukları ortamın zararlı etkilerinden koruyabilmektedir, ayrıca sınırlı bir alan ve miktardaki gıdayı kullanabilmektedir ve diğer mikroorganizmalar ile rekabet edebilmektedirler (Banerjee ve ark. 2011). İlaveten, türler arasındaki metabolik etkileşimlerden yarar sağlayabilmekte ve yeni fenotipik özellikler kazanmak için gen transferleri yapabilmektedirler (Garret ve ark. 2008). Gıda işletmelerindeki borularda ya da faklı alanlardaki akışkan sıvılarda akışlardaki değişimler veya temizlik işlemleri, oluşan biyofilmi parçalayarak yayabilmektedir. Biyofilm oluşumu, gıda işletmelerinde enerji kayıpları, akış ve ısı iletimini azaltılması veya membran gözeneklerini bloke etmesi, gıdaların geri çağırılması ya da toplatılması gibi nedenler ile maddi kayıplara sebep olabilmektedir. Ayrıca bozulma etmeni mikroorganizmalar ve insanlarda patojen olan bakteriler biyofilm oluşturturabilmektedir (Poulsen 1999).

Biyofilm kontrolü ve önlenmesinde mekanik temizleme, antimikrobiyel ajanların (biyositler) kullanımı, önemli besinlerin kaldırılması ile biyofilm gelişimini engelleme, mikrobiyel yapışmaları engelleme, biyokütle çıkarımının desteklenmesi tekniklerinin yanı sıra enzimler, ultrason, elektrik gibi yeni yöntemler de biyofilmle mücadelede kullanılmaktadır (Ünal ve Tayfur 2017). Biyofilm oluşumun kontrolünde besin ve su kısıtlaması, ekipmanların uygun tasarımı ve sıcaklık kontrolü önemli etkenlerdir. Biyofilm oluşumunu engellenmesinde önlem alınırken, (i) biyofilm daha gelişmeden dezenfeksiyon ve temizleme, (ii) hem mekanik işlemler hem de kimyasal reaktifler kullanılarak olgun biyofilmin uzaklaştırılması ve (iii) farklı biyofilm oluşumunu engellemek için biyofilmin dağılımının önlenmesi şeklinde biyofilm gelişimi döngüsünün farklı bölümleri için değişik stratejiler bulunmaktadır. Biyofilmlerin kontrolü öncelikle biyofilm oluşmadan alınan önlemler, biyofilm oluştuktan sonra biyofilm giderimi ve biyofilmin yayılmasını engellemek için kullanılan stratejiler olarak sınıflandırabilmektedir (Zhao ve ark. 2017). Şekil 6'da biyofilm oluşumu ve dağılımı çemberdeki modeller ile gösterilmiştir.



Şekil 2-5. Gıdalarda anti-biyofilm stratejileri (Zhao ve ark. 2017)

Geleneksel kontrol stratejileri kimyasal temellidir, mikroorganizmaların bu tür yöntemlere belirli bir derecede direnç göstermesi veya daha sonra mutasyon veya genetik değişim yoluyla direnç edinmesi mümkündür. Elde edilen bu direnç, bakterilerin daha yüksek dezenfektan konsantrasyonu altında hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır (Gilbert ve Mcbain 2003; McBain ve ark. 2002). Günümüzde, kimyasal yöntemler (üre, CH_2O (formaldehit), ozon, kuaterner amonyum bileşikleri, NaOCl, antibiyotikler, asitler ve diğer dezenfektanlar ve çeşitli deterjanların kullanımı) gibi geleneksel kontrol stratejilerine alternatif olarak biyofilm oluşumunun engellemesinde kullanılan modern yöntemler arasında yüksek basınçlı temizleme sistemleri kullanımı, katalize modifiye yüzeyler, elektriksel alanlar, elektrolize su, ultrason, yüksek hidrostatik basınç uygulamaları, fotokataliz, moleküler fırça, termal olmayan-soğuk plazma uygulamaları, düşük enerjili yüzey akustik dalgaları gibi fiziksel yöntemler ve QS vb. hücre sinyal inhibisyon stratejileri (örn. laktik ve sitrik asitler

olarak), quorum quenching (QQ), enzimatik parçalama stratejileri (selülazlar, proteazlar, glikozidazlar ve DNAzlar gibi), bakteriyofajların kullanımı (P100), bakteriyosinler (nisin gibi), sodyum tuzları, biyosürfektanlar (likenisin veya surfaktin gibi), bitkisel uçucu yağlar (sitral veya karvakrol içeren yağlar gibi), antimikrobiyal peptitler, prebiyotikler, antibiyofilm bileşenleri, D-aminoasitler, çelatlayıcı ajanlar, kitosan türevleri veya bitki özütleri gibi biyolojik yöntemler, metal nanopartikülleri, yüzey modifikasyonları (farklı metal oksitlere sahip nanoparçacıklar, nanokompozitler, antimikrobiyal polimerler, hidrojeller veya lipozomlar) gibi modern teknolojik yöntemler ve bu yöntemleri kombine ederek kullanan engel teknolojisi gibi sinerjik yöntemler kullanılmaktadır (Meyer 2003; Simones ve ark. 2010; Jahid ve Ha 2012; Taraszkiewicz ve ark. 2013; Srey ve ark. 2013; Zhao ve ark. 2017; López-Gálvez ve ark. 2018; Hançer Aydemir 2018; Galie ve ark. 2018). Kullanılan yöntemin etkinliği, uygulandığı yüzey, biyofilmde bulunan mikroorganizma türü ve uygulama metodu ile değişebilmektedir (Meyer 2003). Bu teknolojik yöntemlerden pek çoğunun kullanım alanı sınırlıdır ve hala araştırmalara devam edilmektedir, daha çok diğer yöntemler ile kombine edilerek kullanılmaktadırlar.

Prensip olarak biyofilmleri kontrol etmede en önemli strateji, biyofilm oluşturmadan önce bakterileri ortadan kaldırmaktır (temizlik ve dezenfeksiyon) veya biyofilm oluşumuna dirençli yüzeyler kullanarak biyofilmlerin oluşumlarını önlemektir. Biyofilm oluşumuna dirençli yüzeyler kullanmak yaklaşımında, yüzeylerin fizyokimyasal özellikleri değiştirilmektedir veya antimikrobiyal ajanlar ya da benzildimetildodesilamonyum, klorür ve gümüş gibi diğer maddeler ile kaplama yapılmaktadır (Srey ve ark. 2013). Biyofilm oluşumu birçok Gram pozitif bakteride küçük peptidler şeklindeki QS molekülleri tarafından düzenlenirken, Gram negatif bakterilerde, QS molekülleri N-asil-l-homoserin laktonlardır. Bu nedenle, QS moleküllerinin üretimi veya taşınmasını bozabilecek bir ajanın kullanılması biyofilm oluşumunu azaltabilmektedir. QS inhibitörleri ve quorum quencher yapılar üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Quorum quencher yapılar virülans faktörlerini zayıflatabileceklerinden bakteri ve biyofilmlerin uzaklaştırılmasını teşvik etmektedir (Zhao ve ark. 2017). Antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip yüzey aktif maddelerin (sürfaktan) ilave kullanımı gıda ile temas eden yüzeye yapışmış bakterilerin

yüzeyden ve biyofilmden ayrılmasında rol oynamaktadırlar. Noniyonik özellikteki sürfaktanlar biyofilmi önemli derecede depolimerize etmektedirler (Cloete ve Jacobs 2001). Bunların dışında karbon kaynağının sınırlandırılması, yüzey yapışmasına ihtiyaç duymayan mikroorganizmları desteklemek ve biyofilm oluşumunu teşvik etmeyen, hatta kısıtlayan materyallerin tespiti ve kullanımı ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Simones ve ark. 2010).

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması ve patojenite arasındaki ilişki vardır; patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturması ile antibiyotik dirençleri artış göstermektedir. Özellikle patojen mikroorganizmaların kontrolünde hedef, biyofilm oluşumunun engellenmesidir (Koluman 2006). Biyofilm içindeki hücrelerinin antibakteriyel ajanlara karşı dirençli, planktonik hücrelere göre en az 500 kat daha yüksektir (Costerton ve ark. 1995). Gıda işletmelerinde biyofilm oluşturan bakterilerin yüksek toleransı ve dirençli (a) sanitizer ve dezenfektanların biyofilmlerin hücre dışı karbonhidrat kompleksleri sebebi ile sınırlı difüzyonu, (b) biyofilmler içindeki popülasyonların fizyolojik heterojenliği, (c) dirençli gen aktarımı ile dirençli fenotip gelişimi, (d) antimikrobiyaller, sanitizerler ve dezenfektanların çapraz dirençli ve (e) biyofilm yapılarının inatçı hücreleri gibi sebeplerden kaynaklanmaktadır (Jahid ve Ha 2012). Biyofilmin ayrılmaz bir parçası olan EPS matris, antimikrobiyal ajanların invazyon yolu ile biyofilme nufüz etmesini engelleyerek, biyofilm oluşumunda görev alan bakterilerin direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Olgun ve uzun süredir oluşmuş biyofilmler, yeni oluşan biyofilmlere göre antibiyotiklere ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidir. Bu nedenle erken biyofilm oluşumunu saptayacak non-invaziv yöntemlerin geliştirilmesinin, biyofilmle ilişkili bulaşmaların ve zararların engellenmesinde etkili olacağı düsünülmektedir (Müller ve ark. 2007). Biyositlerin biyofilm içine yavaş veya eksik nüfuzu, biyofilm hücrelerinin değişen fizyolojisi, uyarlanabilir stres cevabının ifadesi ve biyofilm hücrelerinin dirençli hücrelere dönüşümü, artan farklı direnç mekanizmalara sebep olmaktadır (Van Houdt ve Michiels 2010).

Biyofilmleri ana önleme stratejisi, bakterilerin yüzeylere güçlü bir şekilde yapışmasını önlemek için düzenli temizleme ve dezenfeksiyondur (Simones ve ark.

2010; Srey ve ark. 2013; Zhao ve ark. 2017). Ekipman tasarımı, yüzey materyali seçimi ve tesis yerleşimi biyofilm önleme ve kontrol stratejilerinin önemli bir parçasıdır. Tanklar, boru hatları ve bağlantılar gibi iyi ekipman tasarımı, üretim hattının temizlenmesini kolaylaştırır. Bir yüzeyin mikrotopografisi, yarıklar ve diğer yüzey kusurları bağlı hücreleri temizleme zorluklarından koruduğunda temizleme prosedürlerini zorlaştırabilmektedir (Forsythe 2000). İşletmelerde ekipmanların materyali çoğunlukla mekanik taşlama, fırçalama, alıştırma ve elektrolitik veya mekanik parlatma ile işlenebilen çeliktir. Etkili bir sanitasyon programının ön koşulu, proses ekipmanlarının hijyen standartlarının sağlanabilirliğinin göz önünde bulundurularak tasarlanmasıdır. Çıkmazlar, köşeler, çatlaklar, yarıklar, contalar, valfler ve bağlantılarda biyofilmler oluşabilmektedir (Kumar ve Anand 1998; Chmielewski ve Frank 2006). Paslanmaz çelik darbe hasarına karşı koyar, ancak korozyona karşı hassastır, kauçuk yüzeyler bozulmaya eğilimlidir ve bakterilerin birikebileceği yüzey çatlakları geliştirebilmektedir (Forsythe 2000). Paslanmaz çelik yüzeyler cam yüzeyler kadar mikrobiyolojik açıdan temizlenebilir özelliktedir ve biyofilm oluşturmama yönünden, bakır, polimer ve alüminyum yüzeylere göre daha üstün görülmektedir. Ayrıca, biyofilm oluşturan mikroorganizmalar paslanmaz çelik yüzeylerde, polimer yüzeylerde bulunanlara göre daha düşük konsantrasyondaki dezenfektan uygulaması ile etkisiz hale getirilebilmektedir (Boulané 1996).

Tablo 2-3. Gıda üretim alanlarındaki yüzey materyallerinin biyofilm oluşumunu destekleme oranı (Meyer 2003)

Biyofilm oluşumunu destekleme	Material
En az	Cam
	Paslanmaz çelik
	Polipropilen
	Klorine PVC
	Sert (U)PVC
	Kaba-sert çelik
	Polietilen
	Etilen–propilen
En çok	Latex

Meyer (2003), biyofilmlerin oluşmaması için üç farklı strateji önermiştir

(i) Biyofilm gelişmeden önce "zamanında" dezenfeksiyon,

(ii) Etkili dezenfektanlar kullanarak biyofilmlerin dezenfeksiyonu

(iii) Bağlanmayı desteklemeyen yüzey malzemeleri seçerek veya besinlerle takviye ederek mikropların bağlanmasının engellenmesi.

Ekipman yüzeylerinde, partiküllerin ve bakteriyel hücrelerin birikmesi ile biyofilm oluşumunu engellemek için, etkili bir temizlik ve sanitasyon programı, en başından itibaren gıda üretim, işleme, paketleme, depolama ve transport süreclerine

dahil edilmelidir. Ancak sürece uygun olmayan ya da hatalı bir temizlik yönteminin, biyofilm oluşumuna yol açacağı ve biyotransfer potansiyelini artıracağı gözönünde bulundurulmalıdır. Biyofilmlerin yüzeylerden uzaklaştırılması oldukça zorlu ve dikkat isteyen bir işlem olduğundan, eksiksiz ve uygun maliyetli bir temizlik prosedürü geliştirilmelidir (Kumar ve Anand 1998). Etkili bir temizlik prosedürü biyofilm ile ilişkili EPS matrisi mekanik olarak parçlayarak veya kimyasal yöntemlerle çözerek, dezenfeksiyon ajanların yaşayan hücrelere ulaşmasını sağlamalıdır (Chmielewski ve Frank 2003). Temizlik işlemi, işlenecek gıdanın türüne, üretilebilecek kirliliğe, temizlenecek yüzeylerin fizikokimyasal özelliklerine ve yüzeyler ile proses ekipmanındaki potansiyel mikrobiyal büyümeye bağlı olarak seçilen deterjanlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (López-Gálvez ve ark. 2018).

Gıda işletmlerinde üretim alanı ve ekipman yüzeylerin temizlik ve sanitasyonu süreci; mekanik işlemler ve sıcak ya da soğuk su ile kaba kirlerin uzaklaştırılması şeklinde bir ön temizlik, yağ ve proteine etki eden alkali bileşikler, şelatlar, anyonik ajanlar vb. deterjanlar ile kimyasal temizlik, sonrasında durulama ve asitler, halojenler, peroksijenler ve kuaterner amonyum bileşikleri vb. ile muamele ederek dezenfeksiyon basamaklarını içermektedir (Frank 2000). İstenmeyen biyofilmlerin etkili kontrolü, kontaminasyona sebep olan artık madelerin (karbonhidratlar, yağ, proteinler, mineral tuzları) ve yüzeylerden uzaklaştırılacak mikroorganizmaların türü ve doğası anlaşılarak sağlanabilmektedir. Ayrıca ön temizlik aşamasında daha fazla kalıntı giderilmesi, daha sonra ana temizlik ve sanitasyon aşamalarında kullanılan temizlik ürünlerinin miktarını azaltarak daha etkin temizlik ve dezenfeksiyon elde edilmesine yardımcı olmaktadır (Van Houdt ve Michiels 2010). Biyofilmin uzaklatırılması için genellikle gıda işletmelerinde önce yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır. Mekanik temizlik biyofilmlerin giderilmesinde etkilidir. Jel temizleyiciler veya düşük basınçla yapılan temizliğe kıyasla mekanik işlemler arasında yer alan otomatik fırça veya yüksek basınçla temizlik yapılmasının daha etkili olduğu bildilmiştir (Meyer 2003).

Temizlik için yaygın olarak kullanılan kimyasal ürünler, yüzey gerilimini azaltarak, yağları emülsifiye ederek ve proteinleri denatüre ederek gıda artıklarını parçalama ve çözme için kullanılan sürfaktanlar veya alkali ürünlerdir ve kimyasallar

kombinasyon olarak kullanılmaktadır. Asit temizleyiciler çökeltilmiş mineraller veya mineral içeriğine sahip yüksek gıda kalıntılarının temizliği için kullanılmaktadır (Simones ve ark. 2010).

Biyofilm oluşumu için gerekli süre, temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin sıklığına bağlıdır. Sık kullanılan ekipmanlar ve yüzeyleri günde birkaç kez temizlenirken, duvar gibi çevresel yüzeyler ise günde sadece bir kez temizlenmektedir. Çevresel yüzeylerde biyofilm oluşumu için daha fazla vakit vardır ve yapılan araştırmalarda bu yüzeylerde geniş biyofilm yüzey kolonizasyonu oluştuğu bildirilmiştir (Cappitelli ve ark. 2014). Etkin bir dezenfeksiyon için, dezenfektan çözeltisi ile mikroorganizmalar arasında doğrudan temas sağlanması için önce temizlik işlemi yapılmaktadır (Wildbrett ve Escobar 2000). Kullanılacak dezenfektanların hangi durumda daha etkili olacağı, pH, sıcaklık, biyofilmin olgunluk durumu ve biyofilmde bulunan mikroorganizmaların türü ve direnci, dezenfektanların uygulanma konsantrasyonları, uygulanma şekli ve süresi, uygulama yapılacak yüzey ve ekipman özellikleri gibi pek çok değişkene bağlıdır (Van Houdt ve Michiels 2010). Ortamda var olan mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan dezenfektanların ve deterjanların seçimi yapılırken düşük maliyetli, etkin, kolay ve güvenli uygulanabilir olması, kullanıldığı yüzey ve ekipmanları aşındırmaması, ortamdan ve yüzeyden kolay uzaklaştırabilmesi, insan sağlığını etkileyecek veya son ürünün duyusal kalitesini etkileyecek toksik kalıntılar bırakmaması gibi özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır (Simones ve ark. 2010).

Biyofilm oluşumunu önlemek biyofilmler oluştuktan sonra uzaklaştırmaktan daha verimli ve mantıklı bir yaklaşımdır. Ancak, herhangi bir yan etkiye neden olmadan, istenmeyen biyofilmleri tamamen ortadan kaldıran, kullanılabilir önleyici bir yöntem günümüzde mevcut değildir (Mizan ve ark. 2015).

Mevcut biyofilmleri ortadan kaldırmak için kullanılan yöntemler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak sınıflandırılabilmektedir. Fiziksel kontrol methodları, süper- yüksek manyetik alanlar, ultrason uygulamaları, yüksek darbeli

elektrik alanları ve biyositlerle kombine edilmiş düşük elektrik alan uygulamalarını içermektedir (Kumar ve Anand 1998). Kimyasal yöntemler genellikle farklı biyosit ve dezenfektan çeşitleri ile uygulanır ve canlı hücrelere nüfuz etmeyi sağlamak için EPS'yi ortadan kaldıracak kadar etkili olmalıdır. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kombinasyonu biyofilmlere karşı etkinliği artırabilmektedir. Biyolojik yöntemler daha yüksek etkinlik, daha düşük toksisite, daha fazla sürdürülebilirlik ve daha az bakteriyel direnç gelişimine sebep oldukları için daha avantjlıdırlar. Bu yöntemlerin en önemli örnekleri; quorum quenching (QQ), enzimler; enerji ayrıştırma, hücre duvarı hidrolizi ve bakteriyofajların kullanımı gibi uygulamalardır (Malaeb ve ark. 2013).

İstenmeyen biyofilmlerin yüzeylerden uzaklaştırılmasında biyofilmin yapı ve özelliklerine bağlı olarak, mekanik temizlik, antimikrobiyal ajanların kullanımı, gerekli besinlerin sağlanmaması ile biyofilm gelişiminin durdurulması, bir yüzeye mikrobiyal tutunmanın inhibe edilmesi ve biyokütlelerin ayrılmaya teşvik edilmesi şeklinde farklı stratejiler uygulanabilir. Bu stratejilerden en sık kullanılanlar mekanik temizlik ve antimikrobiyal ajanların kullanılmasıdır (Xavier ve ark. 2015). Biyofilmler, EPS matris içine gömülü hücreleri temizlik ve dezenfekte edici maddelere karşı koruyan bir bariyer görevi gördüğünden, temizlikte amaç, EPS tabakasının parçalanmasıdır. Gıda işletmelerinin büyük bir kısmında, temizlik sırasında biyofilmin uzaklaştırılması için yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır (Knetsch ve Koole 2011). Gıda işletmelerin geri dönüşümsüz olarak yapışmış hücrelerin çıkarılması, fırçalama ve kazıma gibi etkili fiziksel yöntemlerle veya enzim, deterjan, yüzey aktif madde, dezenfektan ve / veya ısı kullanılarak uygulanan kimyasal işlemlerle kırılmasını gerektirir (González-Rivas ve ark. 2018).

Gıda endüstrisinde kullanılan başlıca kimyasal bileşenler, halojenler, peroksijenler, asitler ve kuaterner amonyum bileşiklerdir. Bununla birlikte, bunların etkinliği, kirliliklerin ve gıda artıklarının bulunması, su sertliği, uygulama sıcaklığı ve mikroorganizmalarla fiziksel olarak temas bu bileşiklerin etkilerini sınırlamaktadır (Chmielewski ve Frank 2003; Myszka ve Czaczyk 2009). Taşıma sistemlerinde monokloramin ve klor biyofilmin gideriminde en yaygın olarak kullanılan dezenfektanlardır. Yapılan araştırmalarda klorun biyofilm yapılarına kısıtlı seviyede

penetrasyon sağladığı gözlemlenmiştir. Organik karbonla klorun reaksiyona girebilmesi organik yüke fazlasıyla sahip olan taşıma sistemlerinde kalıntı bırakılmasına sebep olabilmektedir. Sistemde klorlu kalıntıların kalması dezenfektan isteğini arttırmaktadır. Monokloraminin klora oranla reaktifliği daha azdır, taşıma sistemlerinde daha yüksek oranda kalıcılığı bulunmaktadır, biyofilmlere penetrasyonu daha iyidir. Klor kullanımında elde edilecek sonuçlar için daha yüksek konsantrasyonda monokloramin kullanılması ve daha uzun temas süresine ihtiyaç duyulması monokloraminin dezavantajlarıdır (Chandy ve Angles 2001). Biyofilmlerin çevreye yayılmasını engellemek için çevresel faktörler ve QS molekkülleri ve sinyalleri kontrol altında tutulmalıdır (Zhao ve ark. 2017).

Kullanılan yöntemlerin kombine olarak kullanılması etkinliklerini arttırmaktadır. Buna en iyi örnek olarak engel teknolojisi (Hurdle Technology) yöntemi verilebilmektedir. Engel teknolojisinin uygulanması, iki veya daha fazla kontrol tekniğini kullanılarak gıdalardaki patojenleri azaltmak için etkili bir uygulama sağlamaktatır. Sodyumhipoklorürün UV radyasyonu ile kombinasyon uygulaması, gıdalardaki patojenlerin etkisini engellemenin en iyi yöntemlerden biridir (Srey ve ark. 2013) veya ozon ve ultrasonun kombine etkisi biyofilmlerin hücre azalması için etkilidir (Chırkena ve ark. 2019).

2.5.1. Biofilm oluşumuna karşı HACCP Uygulamaları

Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP), başta Dünya Sağlık Örgütü (WHO) olmak üzere, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Avrupa Komisyonu, Avustralya ve ülkemizde gıda güvenliğini sağlamada tüm dünyada tanınmıştır. Doğru şekilde uygulanan bir HACCP sistemi uluslararası alanda gıda güvenliğini sağlamanın etkili bir yolu olarak kabul edilmektedir. HACCP sistemi gıda ürünlerinin üretimi, işlenmesi ve taşınmasının her aşamasında ve tüketemi sırasındaki tehlikelerin tanımlama, değerlendirme ve kontrolü için kullanılan bilimsel, rasyonel ve sistematik, önleyici bir yaklaşımdır (Wareing 2010). HACCP sisteminin, tehlike analizlerinin yapılması, kritik kontrol noktalarının

(CCP) belirlenmesi, kritik kontrol noktalarında kritik limitlerin belirlenmesi, her CCP için izleme yöntemlerinin belirlenmesi, düzeltici yöntemlerin saptanması, doğrulama sisteminin kurulması, dökümantasyon ve kayıt sisteminin oluşturulması şekilde yedi temel ilkesi bulunmaktadır. Sistemin kurulumu bu ilkeler doğrultusunda yapılmaktadır (USDA 2016).

HACCP sistemi tehlike analizinde belirlendiği şekilde tanımlanmış CCP'leri yönetmek için kullanıldığı gibi gıda işleme tesislerindeki belirli gıda güvenliği tehlikeleri tanımlamak, önlemek veya azaltmak için kullanılmaktadır. Tehlike analizi, İyi Üretim Uygulamaları (GMP'ler), İyi Hijyen Uygulamalar (GHP'ler) ve İyi Tarım Uygulamalarını (GAP'ler) birleştirerek tehlike kontrolünü sağlayan stratejiyi belirlemektedir (Bryan 1990).

Gıda işletmelerinde, Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktası (HACCP) yaklaşımı bakteriyel biyofilmleri azaltmak ve / veya ortadan kaldırmak için izlenecek en makul yöntemlerden biridir (Bryan 1990; Havelaar 1994). Bakteri biyofilmleri gıda işleme tesislerinde kullanılan HACCP sisteminde özel olarak ele alınmamış olmakla birlikte (Shi ve Zhu 2009), patojenik bakterileri ortadan kaldırmak, biyofilm oluşumunu önlenmek ve gıda ile temas eden yüzeylerde bulunan mikroorganizmaları değiştirmek için yapılan hijyen uygulamaları HACCP sisteminin en önemli ön koşullarından biridir (Hui ve ark. 2002). Gıda işletmelerinde gıda patojenlerinin biyofilm kontrolü için, artık bir zorunluluk olan HACCP sistemi, daha da önemli bir hale gelmiştir. Süt işlemede biyofilmlerin yaygınlığı hem bozulmanın hem de patojenik mikrofloranın önemli bir rezervuarı olup son ürünün bozulmasına ve hastalık yapan mikroorganizmaların bulaşmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, biyofilmlerin değerlendirilmesi, HACCP planı geliştirirken mutlaka göz önünde bulundurulmaldır (Sharma ve Anand 2002).

HACCP sistemini uygularken, belirli bir gıda ürününe, işlemine ve gıdanın hazırlandığı koşullara özgü tehlikeler tanımlanmaktadır ve söz konusu tehlikeye özgü kontrol önlemleri tasarlanmaktadır (Motarjemi ve Lelieveld 2014). Dünyada ve ülkemizde gıda işletmelerinde HACCP sisteminin etkin şekilde uygulanamamasının

temel sebepleri arasında ön koşul programlarının eksikliği ve yetersiz fiziksel koşulların yer aldığı belirtilmiştir (Baş ve ark. 2007). HACCP sistemi, insan sağlığını tehdid eden tehlikelerini oluşmadan öngörerek ve engelleyerek ürün güvenliğini arttırmaktadır. Biyofilmlerin önlenmesi ve müşteri sağlığına verecekleri potansiyel zararları engellemek için gıda ürünlerinin işlenmesi ve formülasyonuna, temizlik ve hijyen prosedürlerinin detaylarına dikkat edilmesi gereklidir (Bryan 1990). HACCP sisteminde izleme prosedürleri, süreci kontrol etmek ve sapmaları tespit etmek için gereklidir. Bu işlem gözlemler ya da biyofilmlerin tespitini de kapsayan mikrobiyolojik örnekleme, sıcaklık kontrolü ve temizlik kontrolleri gibi ölçümler ile yapılabilmektedir (Holmberg ve Wallin 2010). Mikrobiyolojik kriterler, genel olarak bir HACCP sisteminin performansını doğrulamada önemli bir rol oynamaktadır. Gıda işletmelerinde üretim alanlarındaki bakteriyel biyofilmlerin takibi ve kontrolü için biyofilm sanitasyonun değerlendirilmesi HACCP geliştirme sisteminin bir parçası olmalıdır (Sharma ve Anand 2002).

Gıda işletmelerinde HACCP kapsamında patojen mikroorganizmların negatif etkilerine karşı yapılan temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları büyük önem taşımaktadır. Süt ürünlerinde kontaminasyonun ana kaynağı, ekipman yüzeylerinde oluşan biyofilmlerdir (Brooks ve Flint 2008). Temizlikteki mekanik girdinin biyofilmlerin giderilmesinde kritik olduğu gösterilmiştir (Carpentier ve Cerf 1993). Mekanik kuvvet, boru hatlarındaki türbülans akışı ve silindirik tanklardaki püskürtme memeleri ile elde edilebilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda yapılan temizlikler biyofilmlerin giderilmesinde etkilidir (Holah ve Gibson 1999). Gıda sanayinde sökülmesi ve yeniden birleştirilmesi zor ekipmanların temizlenmesi için clean in place (CIP) sistemi kullanılmaktadır. Clean in place (CIP) uygulaması borularla birbirine bağlı kapalı sistemlere uygundur. Bu yöntemde deterjan ve dezenfektan belirli bir süre boyunca belirli bir hızda ve belirli bir sırada sirküle edilmektedir, böylece gıda temas yüzeyleri temizlenip dezenfekte edilmektedir. Bu ekipmanın kendi kendine boşalması ve hiçbir temizlik malzemesi kalıntısı bırakmaması gerekmektedir. Çay, kahve, meyve suyu, çorba, süt sağım makineleri gün sonunda bu şekilde temizlenmektedir. CIP uygulaması süt, biracılık ve meyve suyu tesisleri gibi işletmelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dudeja ve Singh 2017).

2.5.2. Biyofilmlerin tespiti

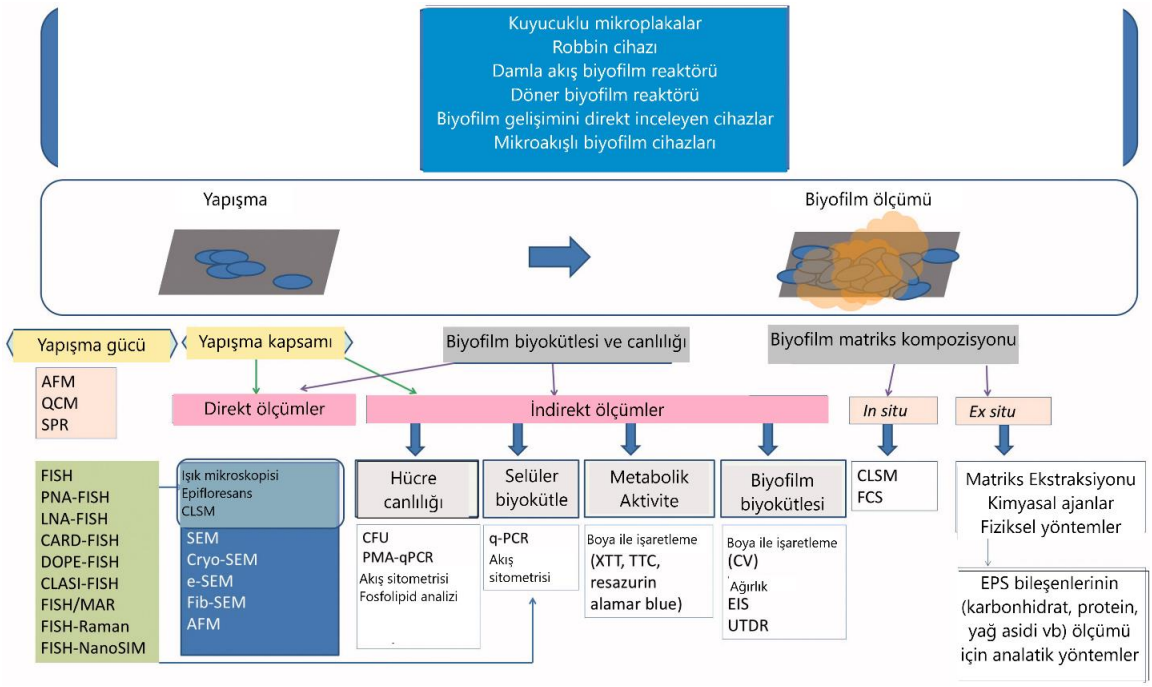
Etkin bir kontrol programı, biyofilmler için yeterli tespit sistemlerine dayanmaktadır. Gıda sanayi, sağlık ve ve diğer endüstri alanlarında biyofilm gelişmesinin engellenebilmesi, biyosidlere oluşan direnç mekanizmalarının çözülebilmesi, biyofilmlerin oluşturduğu sorunları bertaraf edilebilmesi ve yeni stratejilerinin geliştirilebilmesi için biyofilm oluşumunu tespit yöntemlerinin doğru şekilde uygulanması yanısıra yeni tespit yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir. Gıda güvenliğini sağlamak için gıda işletmelerinde biyofilmlerin tespiti için gıda işleme yüzeylerinden, karkaslardan, boru sistemlerinden ve sıvı örneklerinden alınarak düzenli olarak mikrobiyolojik analiz yapılması gerekliliktir (Midelet ve Carpentier 2004; Simões ve ark. 2006).

Biyofilm tespiti, izlemesi ve değerlendirme ile ilgili pek çok yöntem bulunmaktadır. Öncelikle seçilen yöntem yapılacak araştırmanın amacına uygun olmalıdır. Çalışmaların çoğu, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) veya biyofilm karakterizasyonu için standart mikrobiyolojik kültür teknikleri gibi araçlara dayanmaktadır (Donlan 2002). Günümüzde teknolojik gelişmelerin ışığında biyofilm oluşumunu tespit etmede pek çok farklı in vitro ve in-vivo yöntemlerden faydalanılmaktadır. Geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve doğru sonuç veren pek çok yöntem geliştirilmiştir (González-Rivas ve ark. 2018).

Geleneksel yöntemler arasında toplam canlı sayımı, farklı mikroskopi ve spektroskopi teknikleri, empedans ölçümleri ve ATP tayini gibi çeşitli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Her tekniğin avantajları ve kısıtlamaları vardır. Tespit yöntemlerinin iyi seçilmiş bir kombinasyonu, en etkili kontrol yönteminin tayinini kolaylaştırmaktadır (Wirtanen ve ark. 2000).

Araştırma laboratuarlarında biyofilm tespiti ve çalışmaları için gelişmiş mikroskobik, spektroskopik ve immünolojik teknikler bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler karmaşıktır ve komplike ekipmanlara ve uzman kullanıcı personele ihtiyaç

bulunduğu için sanayi de kullanımı pratik değildir (Mortensen 2014). Biyofilm oluşumum tespiti ve takibi için optik, infared, elektrokimyasal, iyon mobilite ve biyolimünens yöntemlere dayalı, güvenilir, online, direkt ve gerçek zamanlı monitoring sistemleri doğru bilgi sağlayabilmektedir (Wirtanen ve ark. 2000).



Şekil 2-6. Biyofilmleri inceleme ve değerlendirme yöntemleri (Azeredo ve ark. 2016)

Biyofilme giren türler ve katılımları, biyofilme ait olmayan organizmaların izolasyonu yapılmadan filogenetik, immünolojik veya morfolojik çalışmalar ile takip edilebilmektedir (Poulsen 1999). Sanayide kullanılan biyofilm inceleme ve değerlendirme metodları direkt ve indirekt yöntemler olarak sınıflandırılabilmektedir (González-Rivas ve ark. 2018). Standart plaka sayımları, roll teknikleri ve sonikasyon, mikroorganizmaları önce yüzeyden ayıran ve daha sonra sayan indirekt yöntemlerdir. Diğer indirekt yöntemler olan radyoaktif olarak işaretlenmiş bakteriler, enzime bağlı immünosorban testi, biyolojik analizler, boyanmış bakteri filmleri ve mikrotitre plakası prosedürleri, bağlı organizma için bazı nitelikleri ölçerek yerinde (in situ) bağlanan organizma sayısını tahmin etmektedir (An ve Friedman 2000). Biyofilmler kültivasyonu dinamik veya statik olmak üzere iki farklı yaklaşımla yapılabilmektedir

(Franklin ve ark. 2015; Azeredo ve ark. 2016). Gıda endüstrisinde durgun biyofilm gelişim ortamlarına; soğutma kuleleri, depolama tankları, stok tankları ve reaktörler örnek verilebilmektedir. Akışlı biyofilm gelişim ortamlarına ise işlem uygulanan, gıda maddesini taşıyan borular, dirsekler ve taşıyıcı bantlar örnektir.

Kültürel yöntemler arasında biyofilm tespiti ve incelenmesinde kongo red agar, tüp aderans yöntemi ve mikrotitre plak yöntemi en yaygın kullanılan indirekt statik yöntemlerdir (Stepanovic ve ark. 2007).

Biyofilm oluşumu çoğu zaman bir kültür tüpünü kaplayan bakteri filminin katyonik bir boya ile boyandığı ve görsel olarak ölçeklendirilmiş tüp aderans testi veya boyanmış bakteri filminin optik dansitenin (OD) spektrofotometrik olarak belirlendiği kuyucuklu mikro plaka (mikrotiter plate) testi ile gösterilmektedir (Christensen ve ark. 1985). Çoğunlukla *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* çalışmalarında kullanılan kuyucuklu mikro plaka yöntemi, statik koşullar altında (taze besinler eklenmeden) elde edilebilecek biyofilm seviyesini belirlemektedir, genetik çalışmalar veya biyofilm oluşumunu etkileyebilecek tarama parametreleri gibi yüksek seviyede tarama gerektiren çalışmalar için avantajlıdır. Bu yöntemin dezavantajı, kristal viyole plaka üzerinde hem hücreleri hem de ekzopolimerik matris bileşenlerini boyabilmektedir ve gerçek hücre sayılarını fazla tahmin edebilebilmektedir (Djordjevic ve ark. 2002).

Freeman ve ark. (1989) tarafından geliştirilen Kongo red agar (CRA) testi, sükroz ve Kongo kırmızısı boya ile takviye edilmiş brain heart infusion agarındaki (BHIA) bakteri suşlarının alt kültürüne ve değerlendirme kriterleri agarda büyüyen kolonilerin renginin görsel analizine dayanmaktadır. Biyofilmin makroskobik tespitinde Kongo red agar yöntemi yaygın olarak kullanılan, görsel sonuçlara dayanan bir yöntem olarak belirtilmiştir (Filik ve Kubilay 2019). Bu yöntemin doğruluğu düşüktür (Liberto ve ark. 2009; Afreenish ve ark. 2011). Erişilebilir yüzeylerdeki mikrobiyal kontaminasyon ATP swap testi gibi swab yöntemleriyle incelenip değerlendirilebilmektedir. ATP tüm canlı organizmaların taşıyıcısıdır ve ATP biyolüminesansının ölçümü yaygın olarak kontaminasyonu izlemek için hızlı yöntem

olarak kullanılmaktadır. ATP luminesans yöntemi gıda kalıntıları ve mikroorganizmalara bağlı toplam ATP miktarını hızlı (5-10 dakika) bir şekilde belileyen biyokimyasal bir yöntemdir (Bagge ve ark. 2001; Mortensen 2014).

Kültüre dayalı geleneksel yöntemler biyofilm tespiti açısından fazla zaman aldıkları ve doğruluk oranları düşük olduğu için HACCP sistemi için uygun değildir. Doğal biyofilmde oluşan canlıların çok büyük bir kısmı kültür içinde tekrar yetiştirilememektedir (Wimpenny ve ark. 2000). Bunun en önemli sebeplerinden biri besin bulunması nedeni ile bakterinin biyofilm oluşturma isteğinin azalmasıdır (Costerton ve ark. 1987). Klasik kültürel yöntemler ile birlikte PCR amplifikasyonu gibi yöntemler kullanılarak daha kesin sonuçlar elde edilebilmektedir (Gião ve Keevil 2014).

Dinamik koşullarda çalışan farklı biyofilm reaktör tipleri geliştirilmiştir. Bu tür sistemler, dinamik koşullar altında biyofilm analizine izin vermektedir ve sürekli besleme kaynağı sağlamaktadır. Bu tür reaktörler, kayma kuvvetleri altında büyütülmüş biyofilmlerin gözlemlenmesine izin vermektedir ve farklı antibiyofilm ajanlarının etkilerini değerlendirmektedir (Azeredo ve ark. 2016). Ayrıca, 3D görüntüleme için tasarlanan akış reaktörleri, sürekli büyüme koşulları altında biyofilm oluşumunun izlenmesini sağlayabilmektedir (Franklin ve ark. 2015). Biyofilm oluşumunun modellendiği akışlı dinamik gelişme ortamlarına örnek olarak “Robbin’s device” isimli alet gösterilebilmektedir (Bagge ve ark. 2001). Kuru kütle tahmini, toplam organik karbon miktarı ve ATP biyolüminesansı diğer indirekt kantitatif yöntemlerdir (Ergin 2017; Wilson ve ark. 2017).

Direkt yöntemler doğrudan mikrobiyal kolonizasyonu gözlemlemeye dayanmaktadır ve temas plakaları, enzimatik reaksiyonları test etme, transmisyon elektronu, konfokal lazer tarama, epifloresans mikroskopi, atomik güç mikroskopisi, tarama elektron mikroskopisi (SEM) ve kriyo SEM, çevresel SEM veya odaklanmış iyon demeti SEM gibi bu tarama elektron mikroskopisinin farklı varyantlarını içermektedir (Abu-Lail ve Beyenal 2013; Azeredo ve ark. 2017; González-Rivas ve ark. 2018). Endüstriyel ortamlarda, en basit izleme yöntemi UV ışığı altında görsel

inceleme için insan duyularını kullanmaktır. Organik tortular beyazımsı veya sarı kaplamalar olarak görünmektedir (Mortensen 2014).

Biyofilm oluşum mekanizması incelemelerinde yüzeylerdeki biyofilmlerin üç boyutlu yapısı mikroskopi yöntemleri ile belirlenmektedir. Taramalı elektron mikroskopisi biyofilm yapısı ve topografyası hakkında ayrıntılar sağlayan en yaygın uygulanan yüksek çözünürlüklü görüntüleme yöntemidir (Bagge ve ark. 2001). Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) yüzeylerdeki biyofilmlerin üç boyutlu yapısı ve polimerlerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde hızlandırılmış elektronlar örneğin yüzeyine çarptırılarak örnekten yansıyan ikincil elektronlar (SE), algılayıcı (dedektör) yardımıyla üç boyutlu görüntü elde edilmektedir. Bakteriyel etkileşimlerin, EPS organizasyonunun ve biyofilm morfolojisinin değerlendirilmesini sağlamaktadır (Pan ve ark. 2016; Dhayakaran ve Neethirajan 2017). Biyofilm hacmini veya toplam yüzey kapsamını tahmin etmek için ışık ve floresan mikroskoplar kullanılabilmektedir (Wilson ve ark. 2017).

Biyofilm online izleme yöntemleri çoğunlukla sisteme harici bir pertürbasyon girişine dayanmaktadır. Daha sonra bu pertürbasyon, kalibre edilmiş bir değere dönüştürülmek üzere uygun bir cihazla ölçülebilir ve/veya amplifiye edilebilmektedir. Yiyecek ve içecek sektöründe, termal nabız analizine dayanan bazı ticari çevrimiçi izleme sensörleri özel olarak tasarlanmıştır. Bu sensörlerde, biyofilm oluşumuna bağlı olarak lokal termal iletkenlik ve ısı değişimleri ölçülmektedir. Bu sistemler sadece birkaç mikrometre kalınlığındaki birikintileri tespit edebilmektedir (Fratamico ve ark. 2009).

Biyofilmin tespitinde ayrıca ekipmanın kalitatif görsel muayenesi, biyofilmlerin mikrobiyolojik özelliklerinin doğrudan ölçümü, üretim hattı boyunca ısı transferi ve basınç düşümü ölçümleri, optik sinyallerin ölçümü, elektrik sinyallerinin ölçümü veya titreşim sinyallerinin ölçülmesine dayanan diğer yaklaşımlar mevcuttur (Pereira ve ark. 2009). Bunun dışında, en son çalışılan metodlar arasında biyofilm topluluk ilişkilerini

inceleyen metagenomik ve metatranskriptomik yöntemleri bulunmaktadır (Galie ve ark. 2018).

2.5.3. Kimyasal Maddeler ile biyofilm oluşumunun engellenmesi

İstenmeyen mikrobiyal büyümeye karşı en yaygın önlem biyositlerin kullanılmasıdır (Flemming ve Schaule 1996). Günümüzde gıda işletmelerinde yüzey aktif maddelerle temizlik ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi kimyasal dezenfektanlar kullanılarak sanitasyon uygulaması hala en yaygın ve en etkili kontrol stratejisi, olduğu belirtilmektir. Ancak rutin temizlik ve sanitasyon yöntemleri ile çevresel streslere uyum sağlayan biyofilmlerin giderilmesi son derece zordur (Mizan ve ark. 2015). Kimyasal biyofilm kontrol metodların etkinliği biyofilm oluşturan mikroorganizma, biyofilm gelişen yüzeye ve kontrol yöntemlerin nasıl uygulandığına göre değişebilmektedir (Meyer 2003).

Biyofilmlerin kontrolüne yönelik mekanik yöntemlerin endüstriyel sistemlerde kullanımı çoğunlukla pratik değildir ve ekipmanın kullanımını kısıtlayabilmektedir (Cloete 2003; Ludensky 2003). Biyofilmler özellikle temizlenmesi ve sterilize edilmesi zor alanlarda oluşması ve biyofilm bakterilerinin kimyasal dezenfektanlara direnci önemli sorunlardır (Sofos ve ark. 2013). Buna rağmen alkali bazlı ve asit bazlı temizlik gibi gıda işleme endüstrisinde kullanılan standart yöntemler, uygun formülasyonlar, konsantrasyonlar, zaman, sıcaklık ve kinetik enerji (akış) gibi doğru proses parametreleri uygulandığında hücre dışı polimerik biyofilm matrisinin uzaklaştırılması için yeterlidir. Uygun olmayan süreç parametreleri genel sonucu büyük ölçüde negatif yönde etkilemektedir (Van Hoult ve Michiels 2010).

Biyofilm ve diğer mikroorganizmaların kontrolü için yapılan yüzeylerin temizlik ve sanitasyonu işleminin aşamaları; kaba ön temizlik (mekanik yöntemler, sıcak veya soğuk su ile kirlerin uzaklaştırılması), kimyasal temizlik maddelerin (yağ ve protein üzerine deterjan etkisi gösteren alkali bileşikler, şelatlar, anyonik ajanlar vb.) uygulaması, durulama ve dezenfeksiyon (halojenler, peroksijenler, asitler ve kuaterner

amonyum bileşikleri vb. ile muamele) uygulaması işlemlerinden oluşmaktadır (Frank 2000). Temizliğin amacı, hücre dışı polisakkarit hazırlık tabakasının bağlarını kırmaktır. Bir bakteri hücresi biyofilm korunmasından ayrıldıktan sonra, temizlik ve sanitasyon yönteminde kullanılan bakteriyosidal dezenfektanlara çok daha az dirençlidir (Deibel ve Schoeni 2003). Mekanik fırçalar gibi fiziksel yöntemler veya deterjan ve biyolojik enzimler gibi kimyasal maddeler biyofilmleri kırmak ve parçalamak için endüstriyel bir ortamda uygulanabilmektedir (Kumar ve Anand 1998; Shi ve ark. 2017). Kullanılan dezenfektan biyofilm organizmalarını öldürmek ve / veya uzaklaştırmak için EPS'ye nüfuz etmeli ve mikrobiyal hücreye erişim sağlamalıdır (Green 1993). Bu nedenle, dezenfeksiyondan önce organik materyallerden oluşan dış tabakayı çıkarmak için bir deterjan aktivitesi gereklidir. Ölü mikrobiyal biyokütle çıkarılmalıdır, aksi takdirde biyofilm oluşumu için bir hazırlık filmi ve besin kaynağı olarak işlev görebilmektedir (Forsythe 2000). EPS matrisin kimyasal bileşimi biyofilmden biyofilme önemli ölçüde değiştiği için spesifik olmayan mekanizmalar tercih edilmelidir (Green 1993). Sürfaktanlar veya alkali kimyasal temizleyiciler yüzey gerilimini azaltarak, yağları emülsifiye ederek ve proteinleri peptize ederek gıda kalıntılarını çözerek çıkarmaktadır (Chmielewski ve Frank 2003). Dezenfektan ve sanitizerler ile biyofilmin giderimini kolaylaştıran sürfaktanlar ve biyofilm degrade edici enzimler özellikle soğutma sistemleri gibi endüstriyel ekipmanlarda ve alanlarda patojenik organizmaların kontrolü için kullanılmaktadır (Forsythe ve Hayes 1998).

Biyosit grubuna giren sanitizer veya dezenfektanlar, mikroorganizmaları, bakteri sporlarını ve virüsleri inaktive edebilen kimyasal bileşiklerdir. Mikroorganizma aktivitesine karşı kullanılan biyositler, mikroorganizma topluluğunun enzimlerini, proteinlerini ve genetik materyali vb. hücre materyalini etkileyerek yok olmasını sağlamaktadır (Güvense ve Ekmekcioğlu 2016). Gıda endüstrisinde, etki şekline göre farklı gruplara ayrılabilen çok çeşitli kimyasal dezenfektanlar kullanılmaktadır: (i) klor bazlı bileşikler, hidrojen peroksit, ozon ve PAA gibi oksidasyon ajanları (ii) kuaterner amonyum bileşikleri ve asit anyonik bileşikleri içeren yüzey- aktif bileşikler ve (iii) iyodoforlar (Van Hoult ve Michiels 2010). Yaygın olarak kullanılan dezenfektan ürünler, klor salgılayan bileşenler, iyot bileşikleri (iyodoforlar), kuaterner amonyum bileşikleri (QAC'ler), alkoller, aldehitler, peroksitler, amfoterikler, biguanidler ve

bisfenollerdir (Ríos-Castillo ve ark. 2017). Mikroorganizmların kontrolü için antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılan biyositler etki şekline bağlı olarak 4 gruba ayrılmıştır (Tablo 7).

Tablo 2-4. Biyositlerin etki şekilleri

Biyositler			
Elektron sevenler		**Membran Aktive Edenler**	
Okside ediciler	Elektron sevenler	Parçalayıcılar	Proton alıcılar
Halojenler	Formaldehit	İndirgeyiciler	Parabenler
Peroksit bileşikler	FA alıcılar	Biguanidler	Zayıf asitler
	İzothiozonlar	Fenoller	Pyrithione
	Bronopol	Alkoller	
	Cu, Hg, Ag		

(Güvense ve Ekmekcioğlu 2016).

Biyofilmle mücadelede, oksidatif biyosidler biyofilm matriksini eritip içindeki sesil mikroorganizmaları öldürerek etki etmektedir. Klor bazlı bileşikler gıda işleme ortamlarında en sık kullanılan dezenfektanlardır ve klor gazı, hipokloritler, kloraminler ve klor dioksit içermektedirler. Korozyon ve buharlaşma sorunları nedeniyle, çoğunlukla soğuk suda uygulanırlar. Yüzey dezenfeksiyonu için kullanılan sodyum hipoklorit biyofilm inaktivasyonu için düşük pH'ta daha etkili bir dezenfektandır (Srey ve ark. 2013). Klor veya peroksoasetik asit gibi oksitleyici maddeler sıklıkla kullanılmaktadır. Su arıtımında klor, Legionella biyofilmlerinin giderilmesinde yüzey aktif kuaterner amonyum bileşikleri veya biguanidler gibi oksidatif olmayan biyositlerden daha etkilidir (Green 1993). Klor oldukça reaktif bir oksitleyici maddedir ve klorun bakterisidal aktivitesi, DNA, proteinler ve lipitleri etkileyen bakteri

hücrelerine geniş hasar veren reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla bağlantılıdır (Dukan ve ark. 1996).

İyodoforlar, karışım suya dağıldığında serbest iyotun salınmasına yardımcı olan bir iyot ve çözündürücü ajan kombinasyonudur. Kuaterner amonyum bileşikleri (QAC) kokusuz, renksiz ve toksik değildir ve bu nedenle genellikle temizlik işleminin bir parçası olarak gıda işlemede kullanılır (McLandsborough 2015). QAC'ler sadece dezenfektan değil, aynı zamanda yüzey aktif madde etkisine de sahiptir, bu nedenle aynı anda temizlik ve dezenfeksiyon için kullanılabilirler, bu durum diğer dezenfektanlar veya deterjanlar için geçerli değildir. Genellikle duvar, tavan ve tavan gibi yüzeylerde daha uzun temas sağlayan sabun olarak uygulanırlar. QAC'ler Gram pozitif bakterileri yok etmede aktifken Gram negatif bakteriler, ölümcül konsantrasyonlarda direnç gösterebilmektedir. Fungal organizmalar ve lipofilik tip virüsler üzerinde etki etmektedirler, ancak hidrofilik virüsler, mikobakteriler veya sporlar üzerinde etki göstermemektedirler. Aşındırıcı veya tahriş edici değildir ve aktiviteleri organik yükten etkilenmemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. tarafından oluşturulan hücre dışı polimer maddelerinin çıkarılmasında sodyum hipoklorit ve anyonik dezenfektanların paslanmaz çelik üzerinde QAC ve iyottan daha iyi olduğunu gözlemlenmiştir (González-Rivas ve ark. 2018). Bununla birlikte, klor bazlı dezenfektanlarla bağdaşmazlar ve pozitif yükleri nedeniyle negatif yüklü deterjanlar ile birleştirilemezler (McLandsborough 2015).

Seyreltici asitler (fosforik asit, perasetik asit ve asetik asit) ve alkali reaktifler (NaOH ve KOH) de sterilize edici ajanlar olarak kullanılabilmektedir. Bu bileşikler nispeten düşük maliyetle bol miktarda bulunmaktadır ve bu nedenle temizlik uygulamalarının bir parçası olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Sadece biyofilmlerin giderilmesine yardımcı olmakla kalmazlar, aynı zamanda proteinler ve karbonhidratlar gibi çok çeşitli biyopolimerlerin yüksek verimli çözündürücüleridir (McLandsborough 2015).

Gıda işleme yüzeylerinin kısa aralıklarla temizlenmesi ve sanitasyonu, vegetative *Bacillus* hücrelerinin oluşturduğu biyofilmlerin sporülasyonunu önlemek için etkili bir yaklaşımdır. Öte yandan, güçlü alkalin temizleme maddeleri, özellikle *S. aureus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı en etkili olarak kabul edilmektedir (Furukawa ve ark. 2010). Son olarak, planktonik ve biyofilm kültürlerini inaktive etmek için hidrojen peroksit veya ozon kullanılmıştır. Bu bileşiklerin çoğunda, sistem pH'sının aktiviteleri üzerinde dramatik bir etkiye sahip olabileceği belirtilmelidir (McLandsborough 2015).

Ozon uygulamasının bir alternatif olarak gıda endüstrisine ilgi uyandırmaktadır. Güçlü oksitleyici özelliklere (klordan %52 daha güçlü) sahip olan bu trioksijen molekülünün, klor ve diğer dezenfektanlardan çok daha geniş bir mikroorganizma spektrumu üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (Güzel-Seydim ve ark. 2004).

Dezenfektanların geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olması, yüzey gerilimini düşürücü, osmotik basıncı arttırıcı ve iyi ıslatıcı nitelikte olması, suda homojen ve kolay dağılıp erimesi, aktivitesini uzun süre koruması ve gerektiğinde kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi tercih edilmektedir. Ayrıca gıda işletmelerinde toksik ve korozif olmayan, kolay uygulanabilir, düşük maliyetli, geniş bir sıcaklık aralığında aktivasyon gösteren dezenfektan ve sanitizerler tercih edilmektedir (Cloete 2003; Ludensky 2003).

Dezenfeksiyonun etkinliği, pH, sıcaklık, konsantrasyon, temas süresi ve gıda partikülleri ve kir gibi karışan organik maddelerden etkilenmektedir. Bu nedenle, deterjanlar ve enzimler gibi temizlik maddeleri, dezenfeksiyon verimliliğini sinerjistik olarak arttırmak için sıklıkla dezenfektanlarla birleştirilmektedir (Van Hoult ve Michiels 2010).

Etkili temizlik ve sanitasyon programları çok önemlidir, aynı zamanda sanitasyon ajanlarının sık sık rotasyonu ve ekipmanın tamamen kurutulması, biyofilm oluşturmaya çalışan mikroorganizmalara engel oluşturmaktadır. Yetersiz temizlik, artık

organik maddenin bulunmasına ve dezenfektanla reaksiyona girmesine izin vererek antimikrobiyal aktivitesini azaltmaktadır. Temizlik ve sanitasyon programları iyi geliştirilmeli, onaylanmalı, doğrulanmalı ve belgelenmelidir (Sofos ve ark. 2013). Biyofilm giderimi ve inaktivasyonu, uygun temizleme ve dezenfektan maddeleri, yeterli maruz kalma süresi, uygun sıcaklık ve mekanik etki birleştirilerek elde edilmektedir. Bu kombinasyon, biyofilmi ve yapıştığı organik materyali çözüp dezenfektanın salınan hassas hücreleri etkisiz hale getirmesine izin vermektedir. Biyofilm gideriminde uygun kimyasallarla kapsamlı mekanik ovma önemlidir. Biyofilmin yeterince uzaklaştırılmaması, kalan hücrelerin büyümesini teşvik edebilmektedir (Sofos 2009). Zayıf asit uygulaması yüzeyi hidrofobik, güçlü asit ve alkali uygulaması yüzeyi hidrofilik yapmaktadır. Paslanmaz çeliğin su ya da havaya teması yüzeyde krom oksit bir tabakası oluşmaktadır. Artık organik maddeler ortaya çıkan krom oksit tabakaya tutunarak, bakterilerin bu yüzeye bağlanması için ortam oluşturmaktadır (Verran ve Jones 2000).

Gıda işletmelerinde kullanılan alkali bileşikler hidroksil iyonları ile proteinleri parçaladıkları ve yağları sabunlaştırdıkları gibi yüksek sıcakılıkarda bakterisid etki gösterirler. Asit deterjanlar ise yüzeyde oluşan protein tabakası, mineral tortuları ve laktik kabuk tabakayı gidermek için kullanılmaktadır. Bir temizlik ürününün gerekli üç temel özelliği; şelatlama, yağdan arındırma ve dağılma güçleridir. Birincisi, mineralleri sekestre etme ve temas ettikleri materyalleri kristalize etme, çökeltme ve kaplamalarını önleme kabiliyeti ile ilgilidir; ikincisi yağları dağıtma ve emülsifiye etme yeteneği ile ilgilidir ve üçüncüsü, parçacıkları kirden ayırma ve süspansiyonda tutma yeteneği ile ilgilidir. Çoğunlukla birlikte kullanılmalıları özellikle dirençli mikroorganizma giderimi açısından daha efektif sonuçlar vermektedir (González-Rivas ve ark. 2018).

Sürfaktanların biyofilmlerle etkileşimleri hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Organik yüzey aktif maddeler (yüzey aktif veya ıslatıcı maddeler) bir uzun polar olmayan veya hidrofobik zincir / kuyruk ve bir polar veya hidrofilik kafadan oluşur ve çözeltideki iyonik yüklerine bağlı olarak anyonik, katyonik veya iyonik olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Anyonik ve noniyonik katyonik sürfaktanlardan daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Amfipolar moleküller suyun yüzey gerilimini

azaltarak temizliğe yardımcı olup böylece yağları emülsifiye ederek "ıslanabilirliği" arttırmaktadır (Holah 1995). Sürfektan ilavesinin çeşitli yüzeyler üzerinde biyofilm büyümesini etkilediği örneğin, anyonik sürfektanlar, klorlu alkalin deterjanlar ve enzim karışımları karşılaştırıldığında anyonik deterjanların biyofilmlerin giderilmesinde daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Biyofilm gideriminde en etkili sürfektan uygulaması yöntemi sırası ile sürfektan ve dezenfeksiyon uygulaması yapılan iki aşamalı bir temizlik işlemidir. Sürfaktanların biyofilmlerin giderilmesinde etkili olabilmeleri için, substrat tabakası ve biyofilm arasındaki ara-yüze nüfuz etmeleri gerekmektedir. Biyofilm matrisine biyofilmin alt tabakasına ulaşmak için nüfuz ederlerse, yüksek yüzey aktiviteleri nedeniyle arayüzde adsorbe edibilmektedirler ve arayüzey gerilimini azaltabilmektedirler. Böylece bakteri yüzeyleri ile substrat yüzeyi arasındaki çekici etkileşimler azaltılalarak filmin kolayca çıkarılmasını sağlamaktadır (McLandsborough 2015).

QS sistemini bozabilecek herhangi bir bileşik biyofilm oluşumunu engelleyebilmektedir. Biyofilm kontrolü ile ilgili son çalışmalar, furanonlar, asilazlar ve laktonazlar gibi QS inhibitörlere odaklanmıştır (Smith ve ark. 2004). Furanonlar, intraselüler yollar vasıtası ile ortamda serbestken veya yüzeye kaplanarak aktivitelerini göstererek QS inhibitörler olarak işlev görürler. Furanonlar reaktif kimyasal sübstitüentlere sahip değildir ve antibakteriyel etkinliği için gerekli olan labil bir lakton halkası içermektedir (Al-Bataineh ve ark. 2006). QS kontrollü biyofilm oluşumunun engellenmesinde yüzeye kaplanan halojen furanonlar bakteri aracılığı ile hücre içine alınmaktadır, luxR tipi proteinlere bağlanarak bu proteinlerin parçalanmasını sağlamaktadırlar (Bauer ve ark. 2005). *S. enterica* ve *E. coli* O103:H2'nın abiyotik yüzeylerdeki biyofilm oluşturmasını engellemektedir ve her iki bakterinin flagellar fonksiyonunu hedeflemektedir (Zhao ve ark. 2017).

Enzim bazlı deterjanların toksik olmayan yeşil kimyasallar olarak da bilinen biyotemizleyiciler olarak kullanılması, gıda işletmelerinde biyofilm giderimi için kullanılabilmektedir (Kristensen ve ark. 2008). Biyofilmin temel bileşenleri protein ve polisakkarit gibi organik makromoleküllerden oluştuğu için proteazlar (serin proteazlar, proteinaz K, pepsin ve tripsin vb.) ve glikozidazlar (amilazlar, dekstranaz ve pektinaz

vb.) biyofilm giderimi için yaygın olarak tercih edilmektedir. Amilazlar, selülazlar, liyazlar, glikozidazlar (örneğin dispersin B) ve DNAzlar, endüstriyel deterjanların bileşeni olarak gıda işletmelerinde biyofilmleri gidermek için endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Galie ve ark. 2018). Bu enzimlerin yanı sıra, quorum-quenching mekanizmasında yer alarak bakteriyel hücre-hücre iletişimini spesifik olarak bloke eden AHL Laktonaz ve AHL Asetilaz gibi bazı enzimler de bakteri popülasyon yoğunluğuna bağlı saldırıyı devre dışı bırakabilmektedir (Zhang ve ark. 2003). Ayrıca deoksiribonükleazlar, glikozidazlar ve proteazlar gibi matris bozucu enzimler, olgun bir biyofilmin dağılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kaplan 2010).

Enzimler, spesifik bir kimyasal molekül üzerinde katalitik aktiviteye sahip proteinlerdir. Gıda işletmelerinde biyofilm giderimi için önemli bir alternatif olabilmektedir. Ancak EPS maktriks heterojen olduğu için kompleksi parçalamak için bir enzim kombinasyonu kullanılması gereklidir (Simões ve ark. 2010). Geleneksel yöntemlerden daha pahalı olmasına rağmen proteolitik enzime dayalı temizleme sistemlerinin kullanımı, bazı durumlarda termik dirençli streptokokların ticari üretim tesislerinin yüzeylerinden uzaklaştırılması için alkali/asit yıkamalardan daha etkili olabilmektedir (Flint ve ark. 1999). Enzimlerle biyofilmin giderimi biyofilm içindeki türlere göre faklılık göstermektedir, bu da istenen verimin alınamasına sebep olabilmektedir. Proteazlar proteinleri hidrolize ederken, amilazlar kompleks ile ilişkili karbonhidrat bağlarını parçalamaktadırlar. 1,4-glikozidik bağ bölen tüm amilazlar arasından, a-amilazlar sıklıkla termostabiliteleri nedeniyle kullanılmaktadırlar; ancak, kalsiyum metaloenzimler oldukları için uzun süre aktif kalamamaktadırlar (Srey ve ark. 2013).

Antimikrobiyal lipitlerin, artmış membran geçirgenliği, hücre lizizi, elektron taşıma zincirinin bozulması ve bakteriyel enzimlerin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hareket ettiği bilinmektedir (Yoon ve ark. 2018). Bu bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri bir süredir araştılmaktadır. Gliserol monolaurat kısmen biyofilm eradikasyon potansiyeline sahiptir. Yapılan, deneysel bir araştırmada kısa zincirli yağ asidi formülasyonu taze sebzelerde *E. coli* O157:H7 biyofilm oluşumuna karşı umut verici bir dezenfeksiyon oranı ile sonuçlanmıştır (Keskinen ve Annous

2011). Ayrıca antimikrobiyel peptidler ile ilgili yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Baltzer ve Brown 2011).

Bakteriler, biyofilm yapısında geliştirdikleri metabolik değişikliklerle endüstriyel biyositlere, biyofilm yapısındaki bakterilerinin planktonik durumlarına göre, 10-100 kat daha dirençlidir (Chapman 2003). Gıda işletmelerinde kontrol stratejisi olarak kullanılan geleneksel dezenfektanların (klor, hidrojen peroksit, kuaterner amonyum klorür, ozon, perasetik asit) biyofilm üzerinde sınırlı bir antimikrobiyal etkisi vardır (Charlebois ve ark. 2017). Ayrıca çevrenin kirliği ve toksik maddeler ile ilgili artan yasal zorunluluklar ve farkındalık biyositlerin kullanımını kısıtlamaktadır, yeni çevre dostu, toksik olmayan bileşiklerin geliştirilmesi ya da kullanımda olanlar seçilirken dikkatli olunması gerektirmektedir (Videla ve Herrera 2005). Tüm bu sebeplerden dolayı yeni kontrol stratejileri veya tamamlayıcı kontrol yöntemleri geliştirilmelidir.

2.6. Nanopartikuller tanımı ve nanopartiküllerin kullanım alanları

Nanoteknoloji nanometre (metrenin 10^{-9}'u) boyutunda, benzersiz yeni uygulamaları mümkün kılan, maddelerin boyutlarını kontrol ederek yapı, cihaz ve sistemlerin tasarım, üretim ve uygulamaları olarak tanımlanmaktadır (Ravichandran 2010).

Nanopartiküller boyutları 1-100 nm aralığında olan tozlar veya parçacıklar olarak tanımlanmaktadır, bu parçacıklar nano boyutlu malzemelerin ve nano teknolojinin temelini oluşturmaktadır (Rao ve ark. 2005). Nanopartiküller basit moleküller değildir, üç katmandan oluşurlar. Bu katmanlar, çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerlerle işlevselleştirilebilen yüzey katmanı, her açıdan çekirdekten kimyasal olarak farklı bir malzeme olan kabuk tabakası ve esasen nanopartikülün merkezi kısmı olan ve genellikle nanopartikülün kendisini ifade eden çekirdeği kapsamaktadır (Shin ve ark. 2016). Nanoölçekteki materyallerin boyutu, morfolojik alt yapısı, şekli ve en-boy oranları, biyolojik, kimyasal ve fiziki

ozellikleri değiştiren en önemli özelliklerdir. Bu özellikler sayesinde pek çok yeni alanda kullanılabilmektedirler (Chouhan 2018).

Nanomateryaller kimyasal, fiziksel ve biyolojik pek çok yöntem ile üretilebilmektedir (Durán ve ark. 2016). Nano partiküllerin üretiminde kullanılan yöntemler yukarıdan aşağı "top down" ve aşağıdan yukarı "bottom up" olarak adlandırılan iki ana başlık altında gösterilebilinmektedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımına dahil olan yöntemler hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esasına dayanmaktadır. Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımı yönteminin esası atomlar veya moleküller ile organik veya inorganik yapı inşa etmeye dayanmaktadır (Ravichandran 2010).

Nanopartiküller, medikal tedavilerden, enerji depolaması için solar ve oksit yakıt pilleri üretimi gibi endüstri üretim branşlarında, günlük kullanılan kozmetik ve giysilerde, optik cihazlar, katalitik, bakterisidal, elektronik, sensör teknolojisi, biyolojik etiketleme ve bazı kanserlerin tedavisine kadar çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Özellikle antibakteriyel aktivite, oksidasyona karşı yüksek direnç ve yüksek ısı iletkenliği gibi olağanüstü özellikleri nedeniyle nanopartiküller son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Hasan 2015).

Nanopartiküllerin kategorizasyonu farklı özelliklerine göre, karbon bazlı nanopartiküller, metal bazlı nanopartiküller ve yarı iletken bazlı nanopartiküller şeklinde yapılabilmektedir (Lewinski ve ark. 2008). Metal nanoparçacıklar sahip oldukları özellikler sayesinde günümüzde özellikle gümüş nanopartiküller, elektronik, malzeme bilimi, nanotıp gibi alanlarda kullanılmakla birlikte bilim adamlarının ilgisini çekmeye devam etmektedir (Bar ve ark. 2009). Bulunduğu ortam ve yüzey ile yüksek temas özellliği ve yüzey özelliklerinin geliştirilmesi nanopartiküllerin yüksek antibakteriyel etkinliği kazandırmıştır. Molekül boyutunun çok küçük olması sebebi ile hücredeki metabolik faaliyetleri olumsuz etkilediğinden hücre zarı için yıkıcı özellik göstermektedir (Krutyakov ve ark. 2008).

2.6.1. Gümüş nanopartikuller

Metal nanopartiküller arasında en fazla kullanılandan biri gümüş nanopartüküllerdir (Sharma ve ark. 2009). Gümüş nanopartiküller benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri (optik, elektriksel ve termal, yüksek elektriksel iletkenlik ve biyolojik özellikleri) yanı sıra düşük maliyeti nedeniyle su arıtma, antimikrobiyal kullanımlar, boyalar, kaplamalar, gıda ambalajları gibi çok çeşitli ticari ürünlerde tıbbi, gıda, sağlık, tüketici ve endüstriyel amaçlar da dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır (Perez 2012; Zhang ve ark. 2016). Kolloidal gümüş (gümüş nanopartüküller), iyi iletkenliği, kimyasal stabilitesi, katalitik ve antibakteriyel aktivitesi gibi ayırt edici özellikler nedeniyle özellikle ilgi çekicidir (Frattini ve ark. 2005). Gümüşün az miktarlarda kullanımı toksik değildir. Gümüş hayvan hücrelerine toksik olmadığı ve *E. coli* ve *S. aureus, S. epidermidis* gibi bakteriler için oldukça toksik etki gösterdiği için güvenli ve etkili bir bakterisidal metaldir (El-Kheshen ve Gad El-Rab 2012). Mikroorganizmaların gümüşe, gümüş iyonlarının hücre içindeki metabolik faaliyetleri düzenleyen proteinleri inhibe edici özelliğinden dolayı direnç geliştirmemektedirler (Krutyakov ve ark. 2008). Negatif yüklü bakteri duvarına bağlanan gümüş (nanopartiküller) NP'ler, yerel hücre duvarında bulunan sitotoksik sinyalleri tetikleyerek aynı anda hücresel zar bütünlüğünü bozabilmektedir (Su ve ark. 2009).

NP'lerin etkileyici özellikleri büyük ölçüde NP'lerin şekline, büyüklüğüne, stabilizatörler ve çevre ortamlarla etkileşimlerine ve ayrıca hazırlanma şekillerine bağlıdır. Bu nedenle nanokristallerin sentezinin kontrol edilebilir olması, daha iyi olmalarını sağlamak için önemlidir. Nanopartikül sentezinde sadece partikül büyüklüğünü değil, aynı zamanda partikül şekli ve morfolojisini de göz önünde bulundurmak ve kontrol etmek gerekmektedir (El-Kheshen ve Gad El-Rab 2012). Nanopartiküllerin üretimi fiziksel, kiyasal ve biyolojik metodları kapsayan 3 yaklaşım ile gerçekleştirilmektedir (Siddiqi ve ark. 2018).

Gümüş parçacık oluşturmada pek çok kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Sürfektan varlığında ya da sürfektan olmadan sulu çözücülerdeki Ag (gümüş) iyonlarının indirgenmesi, elektro-kimyasal indirgeme, ısı buharlaşması, sulu çözücülerde termal dekompozisyon yanı sıra kimyasal ve foto-indirgeme ile radyasyon kimyasal indirgeme gibi poli prosedürler gümüş nanoparçacıklar oluşturmak için kullanlmıştır. Tüm bu sentez prosedürleri, aglomerasyon sırasında metal kolloidlerin oluşumunu kontrol etmek için gerekli olan sürfaktanların varlığında veya yokluğunda asil metallerin indirgenmesini içermektedir (Abed 2017). Gümüş partiküllerin (Ag NP'lerin) en popüler preparatı, gümüş tuzunun sodyum sitrat veya sodyumborohidrid ile kimyasal olarak indirgenmesidir. Bu hazırlık şekli basittir, ancak kararlı ve tekrarlanabilir parçacık oluşturmak için büyük özen gösterilmelidir. Hazırlama aşamasında su ve reaktiflerin saflığı, kullanılan cam eşyaların temizliği kritik parametrelerdir (Budi Harmami ve ark. 2008). Çözeltideki Ag NP sentezi, metal öncüsü, indirgeyici ajanlar ve stabilize edici veya kapatıcı ajan gerektirir. Yaygın olarak kullanılan indirgeyici ajanlar askorbik asit, alkol, borohidrid, sodyum sitrat ve hidrazin bileşiğidir (Siddiqi ve ark. 2018). Çözelti sıcaklığı, metal tuzunun konsantrasyonları ve indirgeyici madde ve reaksiyon süresi de partikül boyutunu etkilemektedir. Metal nanoparçacıklar boyutunu ve şeklini kontrol etmek büyük zorluk oluşturmaktadır (Budi Harmami ve ark. 2008). Tipik olarak sentez, çözünür gümüş tuzlarının sitrat, glikoz, etilen glikol veya sodyum borohidrit gibi indirgeyici ajanlarla indirgenmesiyle meydana gelmektedir. İndirgeme, suda ve organik çözücülerde gerçekleştirilebilmektedir. Oluşan gümüş nanoparçacıkların büyümesini ve birikmesini önleyen stabilize edici bileşiklerin eklenmesi belirleyici bir rol oynamaktadır (Zhang ve ark. 2016; Abed 2017).

Fiziksel yöntemlerde, nanoparçacıklar atmosferik basınçta bir tüp fırını kullanılarak buharlaştırma-yoğunlaştırma ile hazırlanmaktadır. Ag NP'lerin sentezi için kıvılcım deşarjı ve piroliz gibi geleneksel fiziksel yöntemler de kullanılmıştır. Fiziksel yöntemlerin avantajları hız, indirgeyici ajan olarak kullanılan radyasyon ve hiçbir tehlikeli kimyasal içermemesidir, dezavantajları ise düşük verim ve yüksek enerji tüketimi, solvent kontaminasyonu ve düzgün dağılım olmamasıdır (Zhang ve ark. 2016).

Gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezinde bitki, bakteri, maya, alg, virüs vb. canlı organizmalarla kimyasallar kullanılarak nanopartikül sentezlenmektir (Filippo ve ark. 2010). Gümüş nanopartiküller, katalist, optik, antmikrobiyal ve biyomateryal üretimi alanlarında geniş kullanım alanı buldukları için çok sayıda araştırmaya konu olmuşlardır (AbdelRahim ve ark. 2017). Gümüş nanopartiküller kendine has özellikleri nedeniyle endüstriyel malzemelerde, ev ve sağlıkla ilgili ürünlerde, tüketici ürünlerinde, tıbbi cihaz kaplamalarında, optik sensörlerde ve kozmetik malzemelerde, eczacılıkta, gıda endüstrisinde, tıpta teşhis ve ortopedide, antibakteriyel ajanlar olarak, tedavilerde ilaç taşıyıcı ve antikanser ajanlar olarak kullanılmaları gibi pek çok uygulamada kullanılmaktadırlar ve ayrıca antikanser ilaçlarının tümör öldürücü etkilerini arttırmaktadırlar (Chernousova ve Epple 2013). Az miktarda gümüş yüklenmesini sağlayarak düşük maliyet sağladığı için yüksek yüzey/hacim oranları bulunan toz formundaki nano gümüş ve süspansiyonlar anti-bakteriyel olarak kullanılabilmektedir (El-Kheshen ve Gad El-Rab 2012).

Nanogümüşün fiziko-kimyasal özelliklerine göre diğer soy metallere göre avantajları: yüzey plazmonu yayılımı sırasında optik frekansın düşük kaybı, toksik olmaması, yüksek elektriksel ve termal iletkenlik, ortam koşullarında kararlılık, altın ve platin gibi diğer soy metallerden daha düşük maliyetli, yüksek ilkel karakter, ışığın görünür ve uzak IR bölgesinin geniş emilimi, yüzeyi geliştirilmiş Raman saçılması, kimyasal kararlılık, katalitik aktivite ve doğrusal olmayan optik davranış olarak sıralanabilmektedir. Geniş bir antimikrobiyal aktivitesi (bakterisidal ve fungisidal aktivite) de avantajlarına eklenebilmektedir (Chouhan 2018).

Gümüş nanopartiküllerin memeli ve insanlardaki toksik etkileri üzerine pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda negatif etkiler saptanmıştır (Marambio-Jones ve Hoek 2010). Asharani ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada “eşit ve küçük dozda gümüş nanopartiküllerin toksisiteye neden olma potansiyeline sahip olduğu” ve gümüş nanopartiküllerin sitotoksik, genotoksik ve antiproliferatif olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada gümüş nanopartiküllerin, mitokondriyal solunum zincirini etkileyerek reaktif oksijen türleri oluşumuna neden

olduğu ve ATP üretimini etkilediği, bu sebeple DNA hasarına yol açtığı sonucuna varılmıştır.

2.6.2. Gümüş nanopartikullerin gıda sanayinde kullanım alanları

Gümüş nanopartiküllerin gıda alanında kullanımı ve uygulanabilirliği dört ana başlık altında toplanabilmektedir. Bu başlıklar, a- fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi ve gıda işleme, b- patojen mikroorganizma tespiti ve gıda güvenliğinin artırılması, c- biyoaktif maddeler ve nutrasötiklerin taşınması ve kontrollü salınımı, d- ürün kalitesi ve raf ömrünü olumlu yönde etkileyecek ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesi olarak sıralanabilmektedir (Nile ve ark. 2020).

Gümüşün bakteri, fungi ve virüslere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu ve gümüş iyonlarının düşük konsantrasyonda geniş bir antibakteriyel aktivite sergilediği bilinmektedir (Feng ve ark. 2000; Wang ve ark. 2018). Ayrıca Ag NP'ler gıda sektöründe antioksidan olarak da kullanılmaktadırlar (Siddigi ve ark. 2018). Gümüş NP'ler ve nanokompozitleri, gıda endüstrisinde antimikrobiyal ajanlar olarak en yaygın kullanılan nanomalzemeler arasındadır. Kitosan bazlı gümüş içeren nanokompozit filmlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Rhim ve ark. 2006). Gümüş nanokompozitlerin antimikrobiyal aktivitesi, hücre yüzeyinin yapışması ve yırtılması; lipopolisakkaritlerin bozulması, geçirgenlikte artış ve gümüşün kükürt, oksijen veya azot içeren biyolojik moleküllerde elektron verici gruplara bağlanması gibi özellikleri ile ilişkilidir (Pereda ve ark. 2019). Çeşitli gümüş içeren zeolitler veya diğer malzemeler, paketlenmiş gıdaların korunması için gıdaya temas eden malzemeler olarak kullanılmak üzere ABD'de FDA tarafından onaylanmıştır. Gümüş nanopartiküller, membran proteinlerine, çukur oluşumuna, diğer morfolojik değişikliklere bağlanan ve bakteriyel hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretimini destekleyen ve oksidatif stres yoluyla apoptoza (DNA hasarı alan hücrelerin yıkım) yol açan gümüş iyonları üretmektedir (Jaiswal ve ark. 2019).

İnsan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve ekolojik sistemler üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilindiği için gümüş nanoparçacıklar şu anda doğrudan gıdalara eklenememektedir. Bununla birlikte, mikroplara dayanıklı kumaşlar veya biyo-kirlenme olmayan yüzeyler gibi gıda ile ilgili uygulamalar geliştirmek için araştırmalar yapılmaktadır (Alfadul ve Elneshwy 2010).

Ag NP bazlı antimikrobiyal ambalaj, gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ve patojen riskinin azaltılmasında önemli bir rol oynayan umut verici bir aktif gıda ambalaj şeklidir. Bu ambalajlar matris tipine göre bölümlere ayrılmıştır. Kullanılan polimerik matrise bağlı olarak parçalanamayan polimerik madde veya bir polimer veya stabilize edici bir madde tarafından yapılan biyolojik olarak parçalanabilir, yenilebilir bir kaplama filmi olarak ayrılabilmektedir (Carbone ve ark. 2016). Selüloz ve kollajen sosis kılıflarında immobilize edilen Ag NP'ler, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı potansiyel bakterisidal aktivite göstermiştir (Fedotova ve ark. 2009). Gıda ambalajlama ve gıda ile temas eden malzemelerde, serbest bırakılmayacak şekilde tasarlanan antimikrobiyal nanomalzeme olarak genellikle gümüş NP'leri içermektedir, böylece ambalajın kendisi bir antimikrobiyal ajan görevi görmektedir.

Ambalaj materyallerine Ag NP'ler vb. nanomateryal eklenerek materyalin geçirgenliğinin geliştirilmesi, ambalaj materyalinin gıdaya temas eden yüzeyine oksijen absorplama özelliği sağlayarak anaerobik ortam oluşturulması ve buna bağlı olarak antimikrobiyal ve antifungal bir yüzey yaratılması sağlanmaktadır (Dağ 2014).

Ag NP'ler, gıdaya temas eden, servis ekipmanı, bebek malzmeleri, pişirme ekipmanları, kesme tahtası ve diğer mutfak gereçlerinde kullanılarak anti bakteriyel özellikleri arttırılabilmektedir (Miller ve ark. 2008).

Antimikrobiyal aktivite, gümüş nanopartiküllerin yüzey alanına ve boyutuna bağlıdır. Daha büyük yüzey alanı/hacim oranlarına sahip Ag NP'ler daha fazla antibakteriyel verimlilik sergilemektedir (Nafisi ve Maibach 2017). Küçük boyutlu gümüş nanopartiküllerin bazı bakteri türlerinin inhibisyanonda çok iyi etki gösterdiği

saptanmıştır (Das ve ark. 2011). Ag NP'lerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri sırasıyla *B. cereus, S. aureus, C. koseri, P. aeruginosa* bakteri ve *C. albicans*'a karşı test edilmiştir. Ag NP'lerin bakteri hücresine nüfuz ettikleri ve içinde bulunan biyomoleküllerin tiyol, hidroksil ve karboksil gruplarıyla etkileştikleri ve sonunda Ag^{+} iyonlarını serbest bırakarak hayati fonksiyonları deaktive ettikleri öngörülmüştür (Siddigi ve ark. 2018). Gümüş, bakteri hücrelerinin ölümünü tiyol gruplarındaki proteinlerle etkileşime girip onları etkisiz hale getirerek ve zar geçirgenliğini düşürüp hidrojen katyonuyla yer değiştirerek sağlamaktadır (Duncan 2011).

Gram negatif pek çok mikroorganizmada gümüş nanopartiküllerin etkileri araştırma konusu olmuştur. Yapılan bir çalışmada 3–25 nm geniş boyut dağılım aralığında ve 0–100 gr/mL derişim aralığında gümüş nanopartiküller tercih edilmiştir. 75 gr/mL gümüş nanopartikül derişiminde neredeyse tüm mikroorganizmaların gelişimi engellenmiştir (Krutyakov ve ark. 2008). Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel özellikleri partiküllerin yüzey alanı ile ilgilidir, partikül büyüklüğü küçüldükçe antibakteriyel etki artmaktadır, ayrıca gümüş nanopartiküller düşük derişimlerde antimikrobiyal etki göstermektedirler (Baker ve ark. 2005). Gümüş NP'lerin *Bacillus cereus, S. aureus, Citrobacter koseri, Salmonella typhii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pnömoni, Vibrio parahaemolyticus* ve *Candida albicans* gibi mikroorganizmalardaki hücrelerde biyomoleküller ile Ag/Ag^{+}'leri bağlayarak birçok bakterinin büyümesini ve çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir. Daha küçük nanoparçacıkların büyük olanlardan daha toksik olduğu da gösterilmiştir. Gümüş NP'lerin toksisitesi, ortamın büyüklüğüne, konsantrasyonuna, pH'ına ve patojenlere maruz kalma süresine bağlıdır (Siddigi ve ark. 2018).

Antibakteriyel aktivitelerine ek olarak, nanopartiküller son zamanlarda biyofilmleri kontrol etmek veya önlemek için umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir (Wang ve ark. 2018). Gümüş nanopartiküllerin, geleneksel antibiyotiklerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Markowska ve ark. 2013). Gümüş nanopartiküllerin biyofilmin karbonhidrat ve protein içeriğini azaltıp, biyofilmi güçsüzleştirerek biyofilme ilaçların nüfuz etmesine izin verdiği tespit edilmiştir (Namasivayam ve ark. 2013). Gümüş nanopatiküllerin, mikroorganizma türü,

kullanılan antibiyotik konsantrasyonu ve nanopartikül büyüklüğüne bağlı olarak diğer antibiyotikler ile kullanılmasının sinerjitik etikleri olduğu tespit edilmiştir (Gurunathan ve ark. 2014; Zhang ve ark. 2016).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

BHIB dehidre edilmiş besiyerinin, damıtık su içinde 37 g/L olarak homojen dağılımı sağlanmıştır. Sık sık karıştırılarak toz besiyeri tamamen çözünene kadar ısıtılmıştır ve kaplara dağıtılmıştır. Otoklavda 121 °C de 15 dakika sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Soğutulduktan sonra kullanıma kadar buzdolabında (2-8 °C) saklanmıştır. Besiyerinin kontrolü için steril edilmiş deney kabına 5 ml olarak alınan BHI Broth ağzı kapalı bir şekilde 37 ˚C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme görülmemiştir. Bakteri biyofilmlerinin oluşturulması aşamasında kullanılmıştır.

Mueller Hinton Agar (MHA)

Dehidre edilmiş besiyeri, 34,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilip steril petri kutularına 12,5'er mL dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Soğutulduktan sonra kullanıma kadar buzdolabında (2-8 °C) saklanmıştır. Besiyeri kontrolü için hazırlanan MHA petrilerden iki adet 37 ˚C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme görülmemiştir.

Tryptic Soya Agar (TSA)

Dehidre edilmiş besiyeri, 40,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş, otoklavda 121 ºC'da 15 dakika sterilize edilmiş ve steril petri kutularına 12,5'er mL dağıtılmıştır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir. Sterilizasyon sonrası 25 ºC'da pH'sı 7,3±0,2'dir. Besiyeri kontrolü için hazırlanan TSA petrilerden iki adet 37 ˚C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış,

inkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme görülmemiştir. Bakterilerin zenginleştirilmesinde kullanılmıştır.

Tryptic Soya Broth (TSB)

Dehidre besiyeri, 30,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir. Amaca uygun şekilde tüplere ve/ veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121 ºC'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir. Otoklav sonrası 25 ºC'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

Plate Count Agar (PCA)

Dehidre edilmiş besiyeri, 22,5 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş, otoklavda 121 ºC'da 15 dakika sterilize edilmiş ve steril petri kutularına 12,5'er mL şeklinde dağıtılmıştır. Besiyeri kontrolü için hazırlanan PCA petrilerden iki adet 37 ˚C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme görülmemiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak, çok açık sarımsı renkte ve 25 ºC'da pH'sı 7,0±0,2 şeklinde parametrelere uygun şekilde hazırlanmıştır. PCA bakterilerinin sayımı için kullanılmıştır.

Peptonlu fizyolojik tuzlu su (Maximum recovery diluent)

Bileşimi 1,0 g/L pepton ve 8,5 g/L NaCl'dan oluşan dehidre karışım damıtık su içinde 9,5 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Kaplara dağıtılıp, ağzı kapatılarak otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2 olarak ölçülmüştür. Kullanıma hazır hâldeki çözelti berrak ve renksizdir.

Gümüş nanopartiküller

Araştırmada test materyali olarak 100 nm, 20 nm ve 10 nm boyutlarında gümüş nanopartiküller dispersiyon şeklinde sodyum sitratın stabilizatör olarak kullanıldığı sulu tampon çözelti olarak ticari bir firmadan temin edilmiştir. Merck firmasından temin edilen 100 nm, 20 nm ve 10 nm boyutlarında gümüş nanopartikülü (Merck, Ürün Kodu: 576832, 730785, 730793, Almanya) kullanılmıştır. Ag NP; 0.02mg/mL stok konsantrasyonda (sulu dispersiyon) ve 20 ml'lik analitik standartlar temin edilmiştir. Ag NP, literatür araştırmasından elde edilen verilere göre 10 ppm, 20 ppm ve 40 ppm konsantrasyonlarda steril distile suda seyreltilerek uygulanmıştır.

Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, Ürün kodu: 216763, Almanya) Sigma Aldrich firmasından tedarik edilmiştir. H_2O_2 %30'luk olarak uygun molaritede distile su içerisinde dilüte edilerek hazırlanmıştır.

Hipokloröz asit (HCLO)

Hipokloröz asit (HCLO) NHP firmasından tedarik edilmiştir. HCLO 200 mL; 200 ppm olarak uygun molaritede distile su içerisinde dilüte edilerek hazırlanmıştır.

Alkol

Etanol (Merck, Ürün kodu: 1.59010, Almanya) Sigma Aldrich (Merck) firmasından tedarik edilmiştir. Çalışmada % 96'lık etil alkol kullanılmıştır.

3.2 YÖNTEM



Şekil 3-1 Çalışma akış planı

3.2.1 Biyofilmi oluşturulacak suşlarının gücünün belirlenmesi

Bu çalışmada *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076, Oxoid, England), *Escherichia coli* O157 (ATCC 43895, Oxoid, England), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, Oxoid, England) kullanılmıştır. Bakteri zenginleştirme ve sayımları, ilgili standartlara uygun şekilde yapılmıştır *(Salmonella* Enteritidis; ISO 6579, *Escherichia coli* O157; ISO 16654, *Listeria monocytogenes*: ISO 11290-1).

3.2.2 Bakteri zenginleştirme

Suşlar -20º C'de stoklanan kültürlerden direkt 9 mL BHI içerisine eklenmiş 37º C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra Tryptic Soya Agara (TSA, Oxoid, England) çizme plak yöntemi ile çizilerek 37º C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben aynı işlem 3 kere tekrar edilerek, yeniden pasaj yapılıp koloni formasyonu tipik yapıda olana kadar pasajlama işlemi tekrar edilmiştir. Her 3 bakteri türü için aynı işlem uygulanmıştır.

3.2.3 Bakteri sayımı

Bakteri zenginleştirme sonucu oluşan tipik koloni morfolojisine sahip kolonilerden birer adet alınarak BHI içine pasajlanmışve 37º C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır Önceden hazırlanan peptonlu sulardan 8 tane alınıp standa yerleştirilmiştir. BHI içine pasajlanan bakterileri içeren besiyeri içinden mikropipet yardımıyla 1000 µL çekilip 1 numaralı peptonlu su içine boşaltılmıştır. Mikropipetin ucu değiştirilip 1 numaralı peptonlu sudan 1000 µL alınıp 2 numaralı peptonlu suya eklenmiştir. Döngü 8 numaralı peptonlu suya kadar devam edip saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Bu işlemin ardından hazırlanan PCA agarlardan 16 tane alınıp laminar airflow biyogüvenlik kabini içerisinde paralelli (her ekim dilüsyonu için çift agar olacak) şekilde 8'e kadar numaralandırılmıştır. Mikropipet ile 1 numaralı peptonlu sudan 100 mikrolitre alınıp 1 numaralı agar drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Aynı işlem çifti için de yapılmıştır. Ekim işlemi sekizinci dilüsyona kadar yapılmıştır. Ve ekim yapılan agarlar 37 °C etüve 24 saatlik üreme için bırakılmıştır. Kullanılan peptonlu sular ve kirli pipet uçları sterilizasyon için otoklavlanmıştır. Gücü belirlenen bakteri stoklarından 3000 rpm/min santrifüj yapılarak üstteki süpernatant atılmıştır ve bakteri peleti oluşturulmuştur. Oluşturulan pelet üzerine 2000 mikrolitre olacak şekilde dezenfektan ham maddeleri ve dezenfektanlar eklenerek örneklem sürelerinde eklenerek (0, 15, 30, 45 ve 60. saniyelerde) örnek alınarak seri ekimler yapılmıştır.

3.2.4 Biyofilm oluşturma

3.2.4.1 *Salmonella* Enteridis biyofilmi oluşturulması

Bakterilere ait stok kültürlerden 90 ml BHI içine 1 ml eklenerek hazırlanan BHI'lar 24 saatlik inkübasyonu takiben steril bir behere aktarılmış içerisinde lam camları dik pozisyonda sabitlenerek manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek dakikada 100 döngü olacak şekilde manyetik balıkla inkübatör içerisinde 7 gün 37 °C'de tutulmuştur. Lam yüzeylerinde biyofilm oluşumu sağlanmıştır (McKenzie ve ark. 2013).

3.2.4.2 *E.coli O157* biyofilmi oluşturulması

E. coli O157 bakterisine ait stok kültür 9 ml Triptik Soya Broth (TSB) içerisinde üretilerek, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Takiben 200 ml TSB içeren şişeye aktarılarak manyetik karıştırıcı ile beraber inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreç içerisinde şişelerin içine tıraşlı yüzey içeren lamlar bırakılarak 37°C'de 7 günlük inkübasyon süresi içinde biyofilm üretilmiştir (McKenzie ve ark. 2013).

3.2.4.3 *L.monocytogenes* biyofilmi oluşturulması

L.monocytogenes bakterisine ait stok kültür 9 ml Triptik Soya Broth (TSB) içerisinde üretilerek, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Takiben 200 ml TSB içeren şişeye aktarılarak manyetik karıştırıcı ile beraber inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreç içerisinde şişelerin içine tıraşlı yüzey içeren lamlar bırakılarak 37°C'de 7 günlük inkübasyon süresi içinde biyofilm üretilmiştir (McKenzie ve ark. 2013).

3.2.5 Dezenfektan hammaddelerinin seçimi ve etkinliklerinin belirlenmesi

Dezenfektan ham maddesi olarak %10'luk 10 nm Ag NP, 200 ppm HCIO ve %6'lık H_2O_2 kullanılmıştır. Kullanılan miktarların belirlenmesinde EPA veri tabanı ile Ansari ve arkadasları tarafından yapılan çalışmadan faydalanılmıştır (Ansari ve ark. 2015). Dezenfektan ham maddeleri *Salmonella* Enteriditis, *L. monocytogenes* ve *E. coli*

O157 bakterileri üzerinde test edilmiştir. 1 dakikalık temas süresi içinde oluşan logaritmik azalmalar MHA ‘a ekim yapılarak tespit edilmiştir. Bu süreç içerisinde 6 logaritmik bakteri üzerine doğrudan eklenen dezenfektanlar ilgili süre boyunca temas ettirilmiş ve sayımı yapılmıştır.

3.2.6 Dezenfektan tasarımı

Dezenfektan tasarımı yapılırken gruplar hazırlanmış ve her bir grubun içerisinde farklı kimyasalların olması hedeflenmiştir. Buna bağlı hazırlanan 8 dezenfektanın içerikleri tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3-1. Biyofilm giderimi için oluşturulan gümüş nanopartikül (Ag NP) içeren dezenfektan karışımları

İçerik	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Ag NP (10 nm)	%10		%20		%10			
Ag NP (20 nm)		%10		%20	%10			
Ag NP(100 nm)						%10	%20	%10
HClO	200 ppm	0	200 ppm	0	0	0	200 ppm	0
H_2O_2	0	%6	0	%6	0	0	0	%6

3.2.7 Dezenfektanın uygulanması ve güç tayini

Dezenfektanların hazırlanmasına takiben elde edilen suşlar santrifüjde 3000 rpm/min olacak şekilde santrifüjlenmiş ve ardından steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanarak bir kere daha santrifüjlenerek pelet elde edilmiştir Elde edilen pelet üzerine dezenfektanlardan 1 ml eklenerek inkübasyona (oda sıcaklığında bir dakika) bırakılmıştır. Süre sonunda ekim yapılarak bakteri sayımı yapılmıştır**.**

3.2.8 Biyofilm görüntüleme

E. coli O157 biyofilminin morfolojisini gözlemlemek için dezenfektan karışımı uygulaması sonrası ve öncesinde SEM kullanılarak gözlemlenmiştir. SEM (Zeiss, Almanya) analizleri bölüm laboratuvarlarında gerçekleştirilen örnek hazırlığının ardından, görüntüleme işlemleri Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Elektron Mikroskopi Laboratuvarı'nda hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşturulan lamlar çelik levhalar üzerine sabitlenmiştir. SEM analizlerini elde etmek maksadı ile lamların aktarıldığı paslanmaz çelik levhalar öncelikle 10 mL TPS (Tamponlanmış peptonlu su) kullanılarak hafifçe yıkanmıştır. Ardından oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca %2,5'lik gluteraldehit uygulaması ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gluteraldehit şırınga yardımıyla yüzeyden çekilerek, levhaların havada kuruması sağlanmıştır. Ardından levhalar vakum altında altın kaplanarak SEM ile analiz edilmiştir. Sem analizinde farklı büyüklüklerde biyofilm ve gümüş nanopartikül ölçümleri yapılmıştır.

3.2.9 Dezenfektanların restaurantlarda uygulanması

İstanbulda bulunan bir restoran zincirinin şube mutfaklarındaki biyofilm oluşumuna uygun yüzeylerden alınan örnekler üzerinde kullanılmıştır. Örnekler 8 restoran mutfağından farklı (evye, kesim tezgahı, yüzey) noktalardan dezenfektan uygulama öncesi ve sonrası olacak şeklinde toplamda 64 numune alınmıştır. Örnekler yüzey swabı şeklinde, hazırlanan dezenfektan karışımları ile dezenfeksiyon işlemi öncesi ve sonrası alınarak, PCA'ya ekim yapılarak uygulama yapılmıştır. Restoranlardan alınan PCA'ya ekim yapılan petri kutuları 37 ºC'da 48 saat inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonunda besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve oluşan toplam mezofil aerob bakteri sayısı hesaplanmıştır.

İşletmelerde örnek alınan noktalar ve uygulama tablo 3-2'de gösterildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3-2 Restoran mutfaklarından numune alınan alanlar

Restoran	**mutfak evyesi**	**gıda hazırlık için kullanılan yüzey**	**kesme tablası**
8	16	8	8

4 BULGULAR

Bu çalışmada ilk aşamada gümüş nanopartiküller ve bu partiküller ile karışım sağlanarak hazırlanacak dezenfektan ham maddeleri gıda patojenleri üzerinde test edilmiş, daha sonra bu dezenfektanlar ve gümüş nano partiküller kullanılarak üretilen farklı dezenfektan formülasyonları oluşturulmuştur.

Çalışma kapsamında 8 farklı gümüş nanaopartikül içeren dezenfektan karışımı kullanılmıştır. Yapılan çalışmada gıdalar ile insanlara bulaşabilen ve en yaygın gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan patojen bakterilerden olan *E. coli* O157, *Salmonella* Enteritidis ve *L. monocytogenes* üzerinde denemeleri yapılmıştır. Söz konusu bakterilerin biyofilmleri üzerinde tasarlanan dezenfektanlar kullanılmıştır. Daha sonra İstanbul'da bulunan bir restoran zincirinin şube mutfaklarındaki biyofilm oluşumuna uygun yüzeylerden alınan örnekler üzerinde kullanılmıştır. Örnekler 8 restorandan farklı 4 noktadan toplamda 64 numune alınmıştır.

Çalışma sonucunda gümüş nanopartikül ile oluşturulan dezenfektanların gıdalarda patojen olan bakterilerin oluşturdukları biyofilmler ve gıda işletmelerde biyofilm oluşacak yüzeylerin dezenfeksiyonunda oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki MIC değerler için EPA veri tabanı ve Ansari ve arkadasları tarafından yapılan çalışmadan faydalanılmıştır (Ansari ve ark. 2015). Çalışmada gümüş nanopartikül (Ag NP), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit (HClO) ham madde olarak kullanılmış ve bahsedilen patojen bakteriler üzerinde etkinlikleri test edilmiştir.

4.1 Dezenfektan ham maddelerinin etkinliklerin değerlendirilmesi

Yapılan çalışmanın birinci aşamasında gıdalar ile insanlara bulaşabilen ve en yaygın gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan patojen bakterilerden olan *E. coli*

O157, *Salmonell*a Enteritidis ve *L. monocytogenes* üzerinde dezenfektan karışımı için kullanılacak ham madde denemeleri yapılmıştır. Kullanılan dezenfektanların farklı temas sürelerinde canlı bakteri sayıları ve logaritmik azalmaları belirlenerek aktiviteleri test edilmiştir. 5 ayrı deneme yapılmıştır.

4.1.1 *Salmonella* Enteritidis üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini

Yapılan 1. denemede *Salmonella* Enteritidis üzerinde dezenfektan tasarımında kullanılacak ham maddelerin etkisi şekil 4-1'de gösterilmiştir. Bu kapsamda, en etkin azalmanın 30 saniye içerisinde Ag NP ve hidrojen peroksit tarafından yapıldığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın birinci dakikasında dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalmanın sadece H_2O_2'de gözlemlenmiştir.

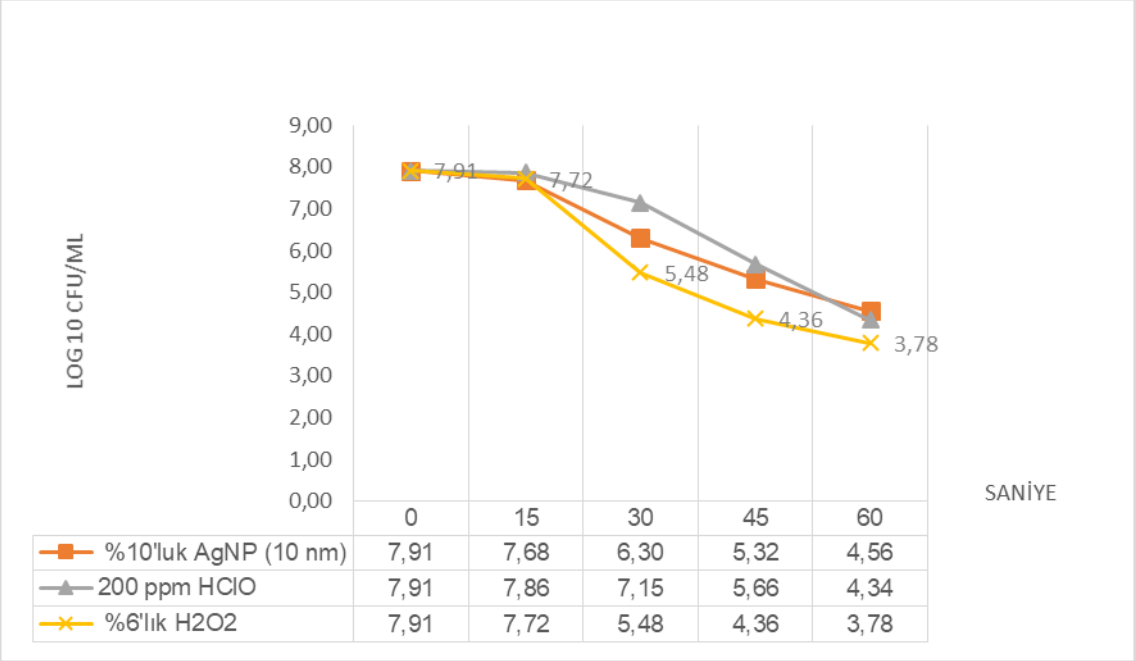
Yapılan 2. denemede *Salmonella* Enteritidis üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-2'de gösterilmiştir. Bu kapsamda, en etkin azalmanın 45 saniye içerisinde Ag NP ve hipokloröz tarafından yapıldığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın 45. saniyesinde dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalmanın tüm dezenfektanlar tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir, toplamda 1 dakika içerisinde 5 logaritmik azalma gerçekleşmiştir.

Yapılan 3. denemede *Salmonella* Enteritidis üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-3'de gösterilmiştir. Bu kapsamda, en etkin azalmanın 30 ve 45 saniye aralığında Ag NP ve hidrojen peroksit tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın birinci dakikasında dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalma tüm dezenfektan ham maddeleri tarafından sağlanmıştır.

Yapılan 4. denemede *Salmonella* Enteritidis üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-4'de gösterilmiştir. Bu denemede, en etkin azalmanın 30 ve 45 saniye aralığında Ag NP tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın birinci dakikasında

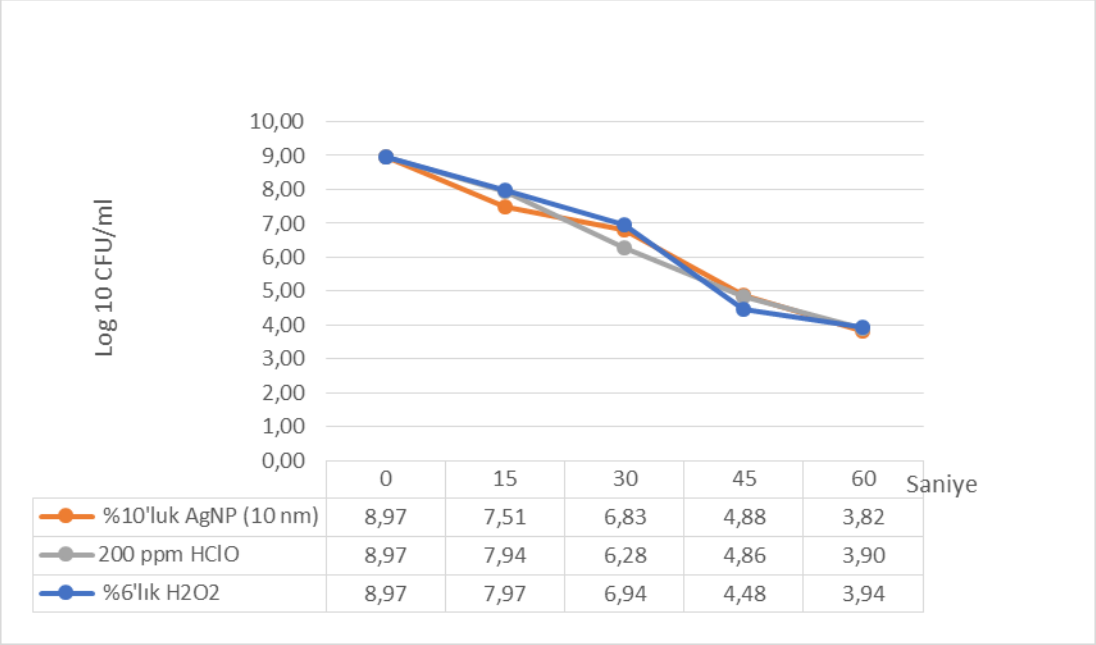
dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalma Ag NP ve hipokloröz asit tarafından sağlanmıştır. En efektif dezenfektan ham maddesi bu denemede 5,29 logaritmik azalma ile hidrojen peroksit olarak gözlemlenmiştir.

Yapılan 5. denemede *Salmonella* Enteritidis üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4.5'de gösterilmiştir. Bu denemede, en etkin azalmanın 30 ve 45 saniye aralığında hidrojen peroksit tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın 45. saniyesinde dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalma Ag NP ve hidrojen peroksit tarafından sağlanmıştır. En efektif dezenfektan ham maddesi bu denemede 5,1 logaritmik azalma ile hipokloröz asit olarak gözlemlenmiştir



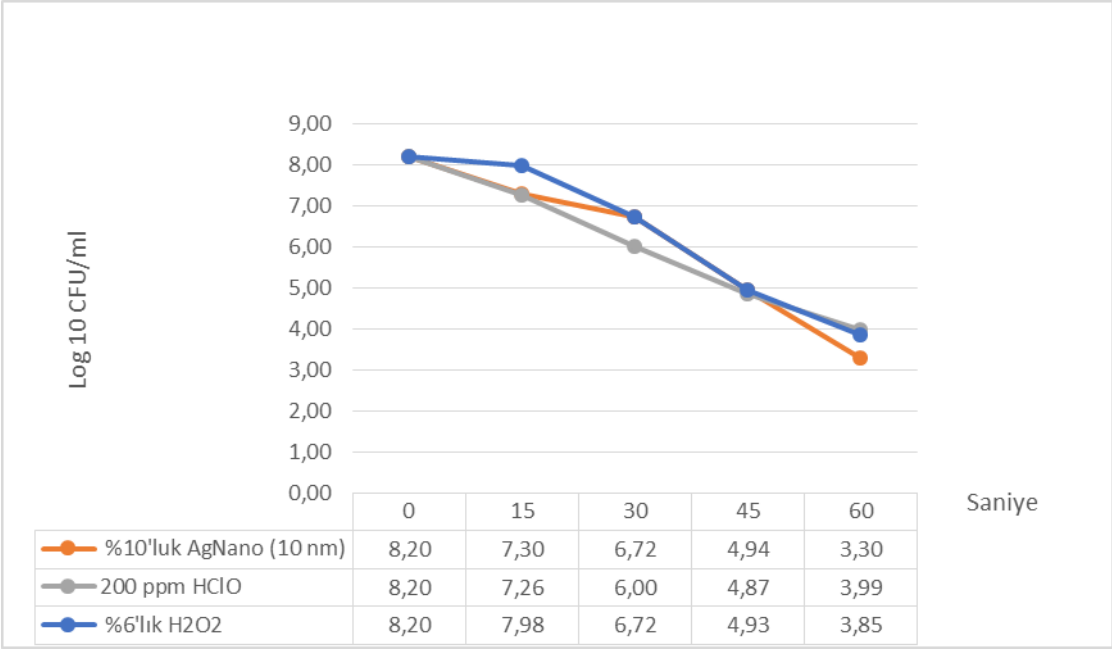
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	7,91	7,68	6,30	5,32	4,56
200 ppm HClO	7,91	7,86	7,15	5,66	4,34
%6'lık H2O2	7,91	7,72	5,48	4,36	3,78

Şekil 4-1. *S.* Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 1



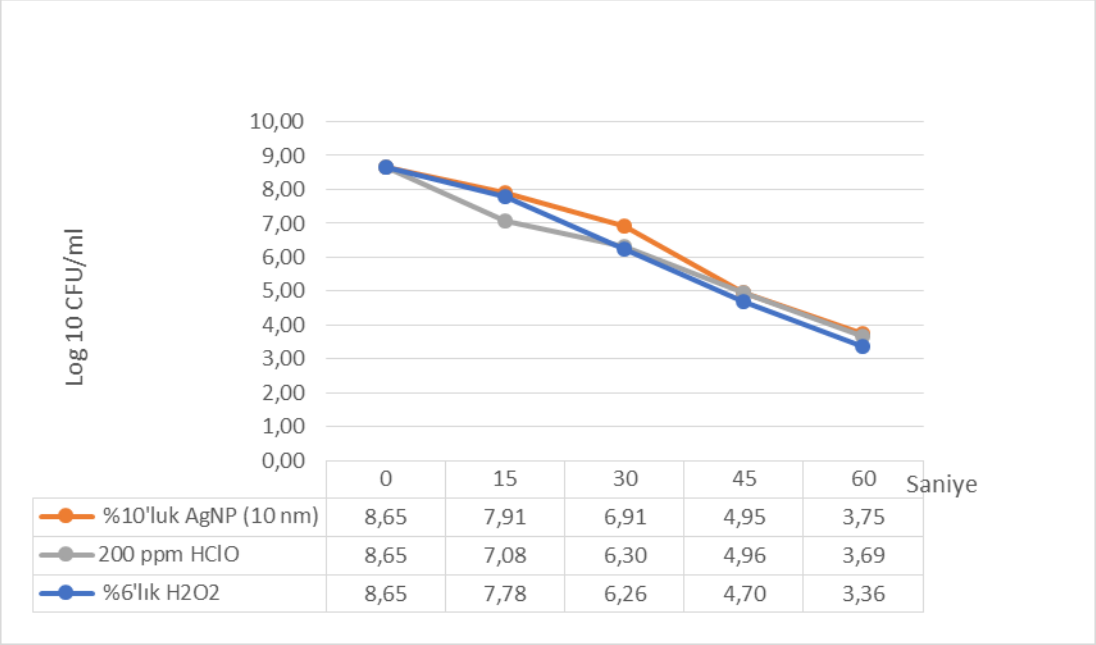
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,97	7,51	6,83	4,88	3,82
200 ppm HClO	8,97	7,94	6,28	4,86	3,90
%6'lık H2O2	8,97	7,97	6,94	4,48	3,94

Şekil 4-2. *S.* Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 2



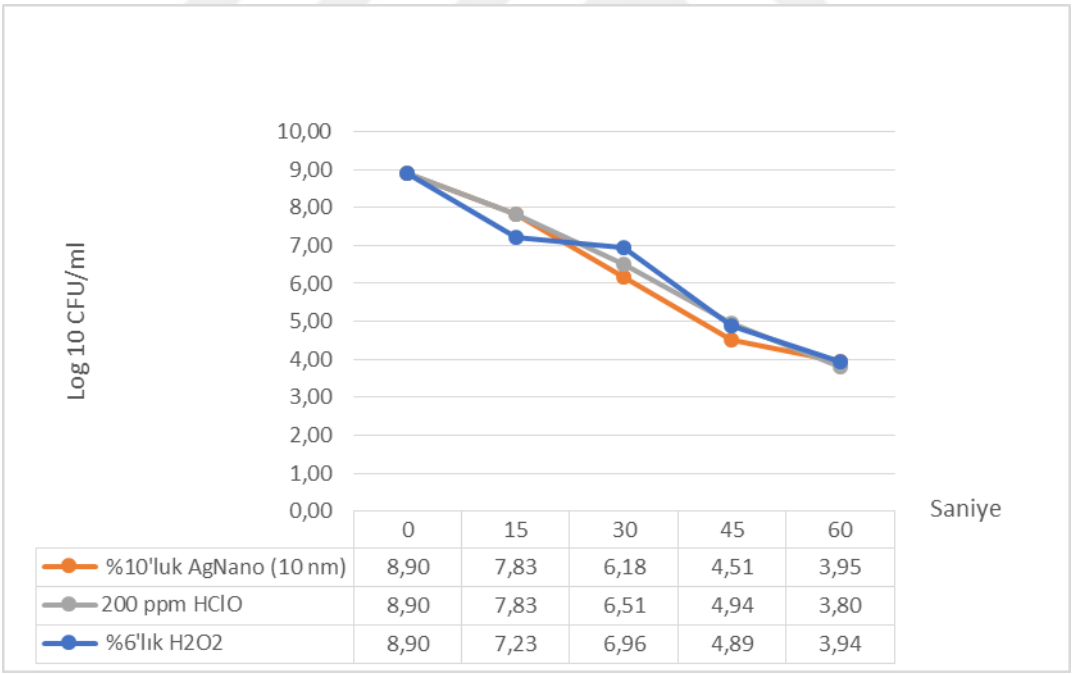
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNano (10 nm)	8,20	7,30	6,72	4,94	3,30
200 ppm HClO	8,20	7,26	6,00	4,87	3,99
%6'lık H2O2	8,20	7,98	6,72	4,93	3,85

Şekil 4-3.*S.* Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 3



	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,65	7,91	6,91	4,95	3,75
200 ppm HClO	8,65	7,08	6,30	4,96	3,69
%6'lık H2O2	8,65	7,78	6,26	4,70	3,36

Şekil 4-4. *S.* Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 4



	0	15	30	45	60
%10'luk AgNano (10 nm)	8,90	7,83	6,18	4,51	3,95
200 ppm HClO	8,90	7,83	6,51	4,94	3,80
%6'lık H2O2	8,90	7,23	6,96	4,89	3,94

Şekil 4-5. *S.* Enteritidis üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 5

4.1.2 *Listeria monocytogenes* üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini

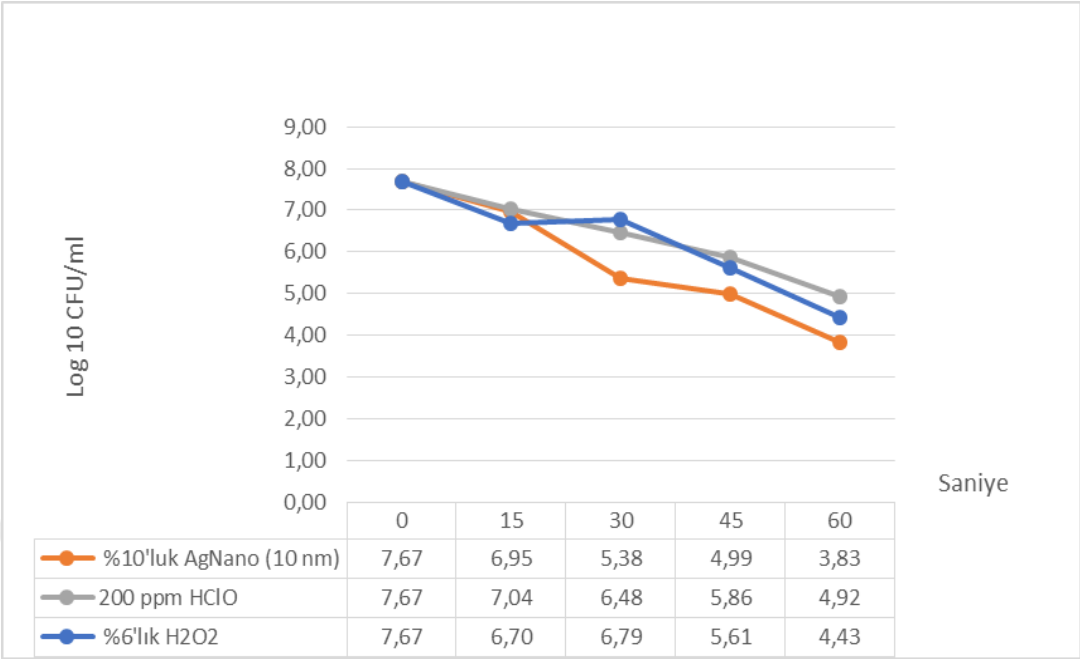
Listeria monocytogenes üzerinde etkisi olan dezenfektanda kullanılacak ham maddelerin 1. denemedeki etkisi şekil 4-6'da gösterilmiştir. Bu kapsamda, 1. denemede en etkin azalmanın 30 saniye içerisinde %6'lık H_2O_2 tarafından yapıldığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın birinci dakikasında dezenfektan etkinliği için önemli 3,84 logaritmik azalma sadece %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektanda gözlemlenmiştir.

Yapılan 2. denemede 1 dakika sonunda %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektanda ve %6'lık H_2O_2'de 4 logaritmik azalma ve 200 ppm'lik hipokloröz asitte5 logaritmik azalma gözlemlenmiştir. 15'er saniyelik aralıklar olarak incelendiğinde en hızlı azalma 1,79 'luk logaritmik azalma ile hipokloröz asit tarafından sağlanmıştır (Şekil 4-7).

Yapılan 3. Denemede 1 dakikalık süre içinde *Listeria monocytogenes* bakterilerinde kullanılan tüm dezenfektanlar tarafında 4 üzerinde bir logaritmik azalma sağlanmıştır. Kalan canlı hücre sayıları birbirine yakın olmakla birlikte en iyi etkinliğin %6'lık H_2O_2 tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-8).

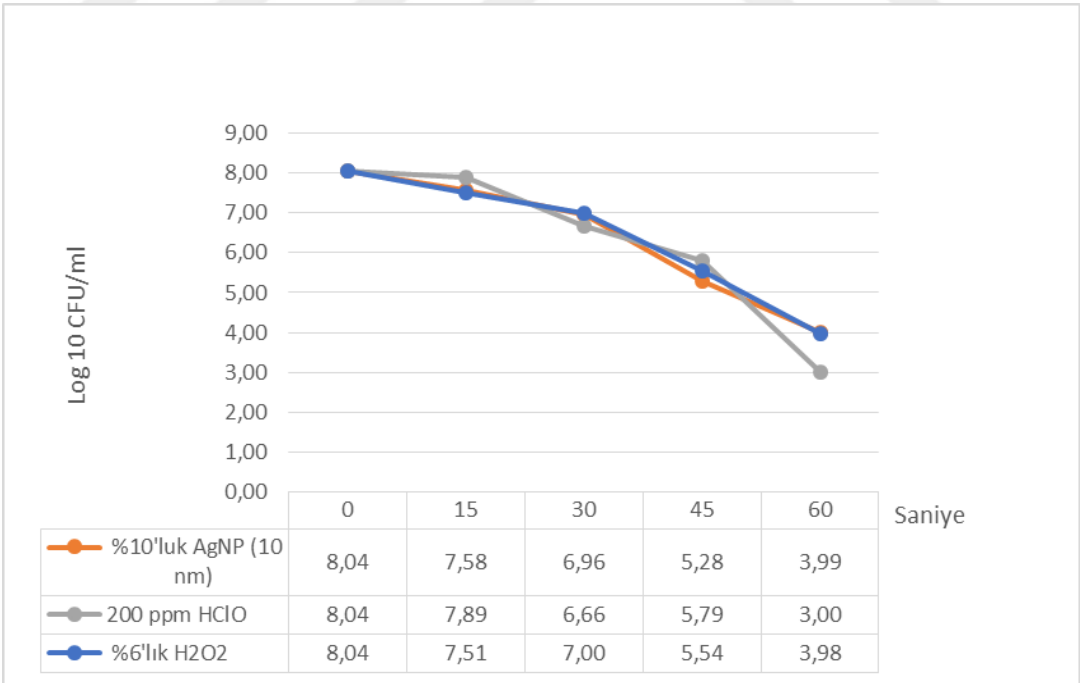
Yapılan 4. denemede 1 dakikalık süre içinde kullanılan her üç dezenfektan ham maddesi de 5 logaritmik azalma sağlamıştır. Kullanılan ham maddelerden bu denemede en iyi etkinliğin %6'lık H_2O_2 tarafından sağlandığı gözlemlenmiştir. Kullanılan %6'lık H_2O_2, 45-60 saniye aralığında 2 logaritmik azalma sağlamıştır. Her 3 dezenfektan ham maddesinin en büyük azalmayı bu aralıkta sağlamıştır (Şekil 4-9).

Yapılan 5. denemede % 10'luk 10 nm Ag NP dezenfektan 1 dakika sonunda 4 logaritmik birim azalma sağlamıştır. Bu denemede %6'lık H_2O_2 ve 200 ppm'lik hipokloröz asit canlı bakteri sayısında 5 logaritmik azalma sağlamıştır. Hipokloröz asit 45-60 saniye aralığında 2,24 lük bir logaritmik azalma sağlarak 15 saniye aralığında ve toplamda en fazla etkinliği göstermiştir (Şekil 4-10).



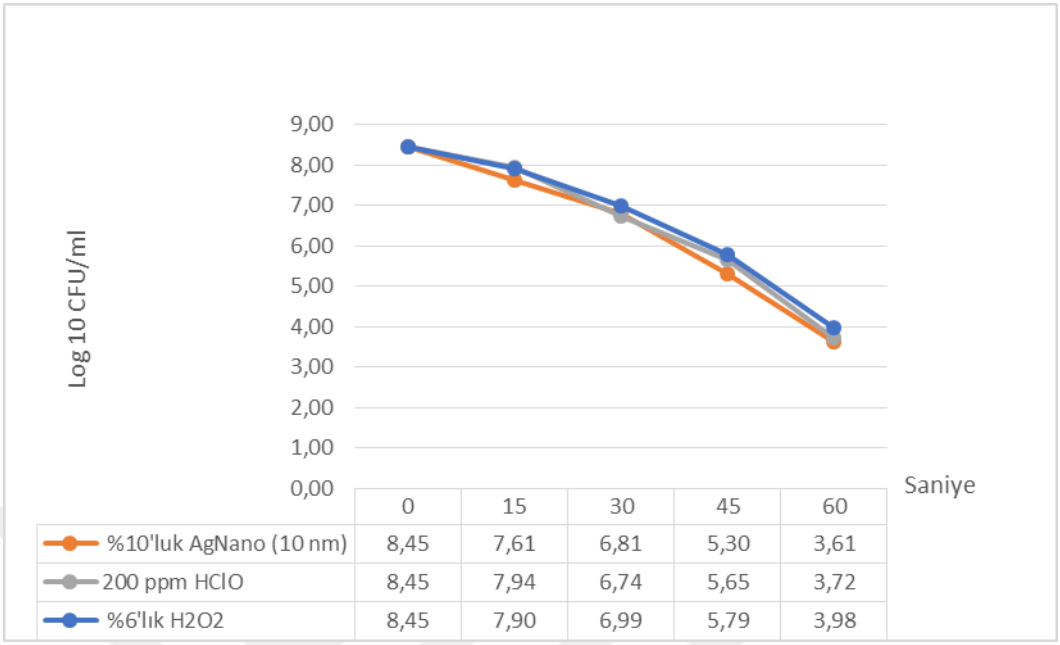
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNano (10 nm)	7,67	6,95	5,38	4,99	3,83
200 ppm HClO	7,67	7,04	6,48	5,86	4,92
%6'lık H2O2	7,67	6,70	6,79	5,61	4,43

Şekil 4-6. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 1



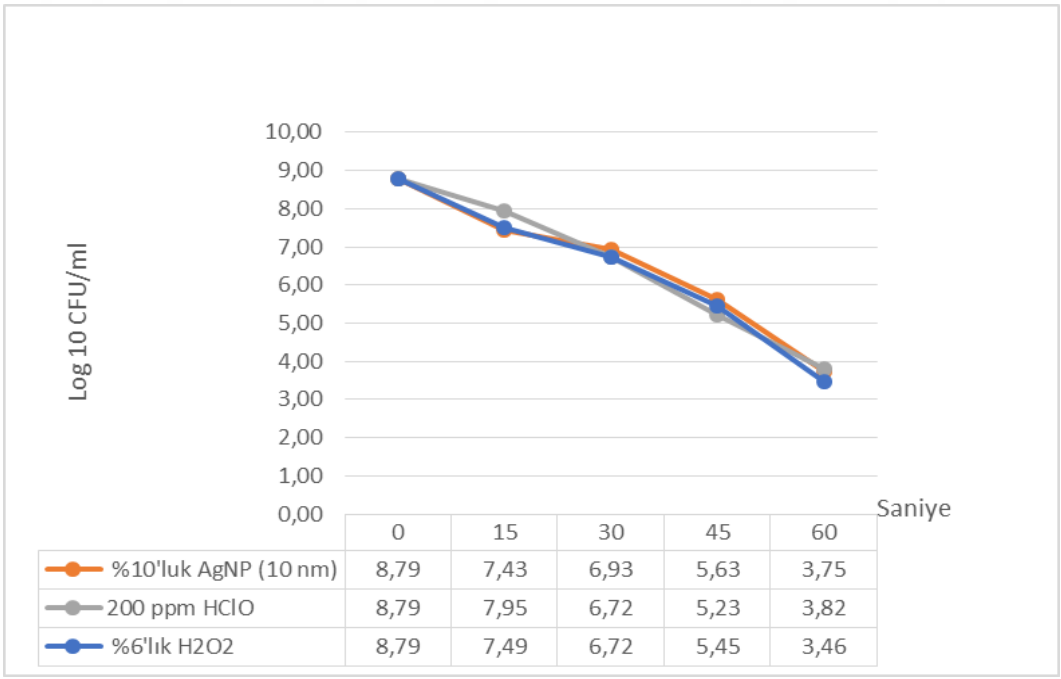
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,04	7,58	6,96	5,28	3,99
200 ppm HClO	8,04	7,89	6,66	5,79	3,00
%6'lık H2O2	8,04	7,51	7,00	5,54	3,98

Şekil 4-7. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 2



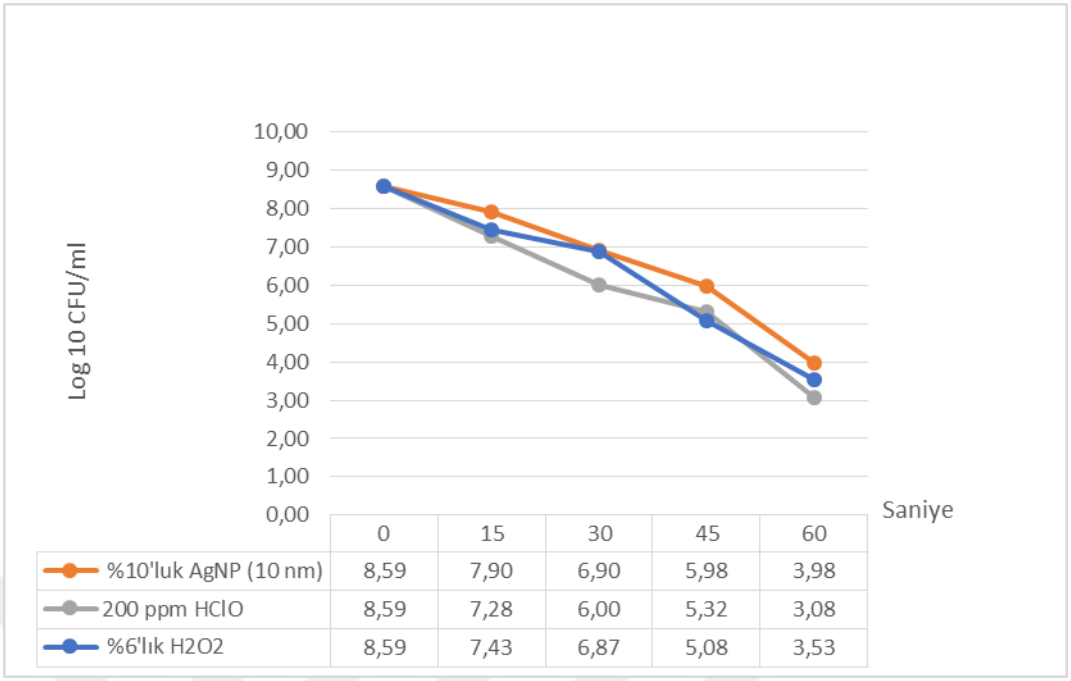
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNano (10 nm)	8,45	7,61	6,81	5,30	3,61
200 ppm HClO	8,45	7,94	6,74	5,65	3,72
%6'lık H2O2	8,45	7,90	6,99	5,79	3,98

Şekil 4-8. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 3



	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,79	7,43	6,93	5,63	3,75
200 ppm HClO	8,79	7,95	6,72	5,23	3,82
%6'lık H2O2	8,79	7,49	6,72	5,45	3,46

Şekil 4-9. *L.* monocytogenes üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 4



Şekil 4-10. *L. monocytogenes* üzerinde yapılan dezenfektan ham madde denemesi 5

4.1.3 *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham maddelerinin etkinlik tayini

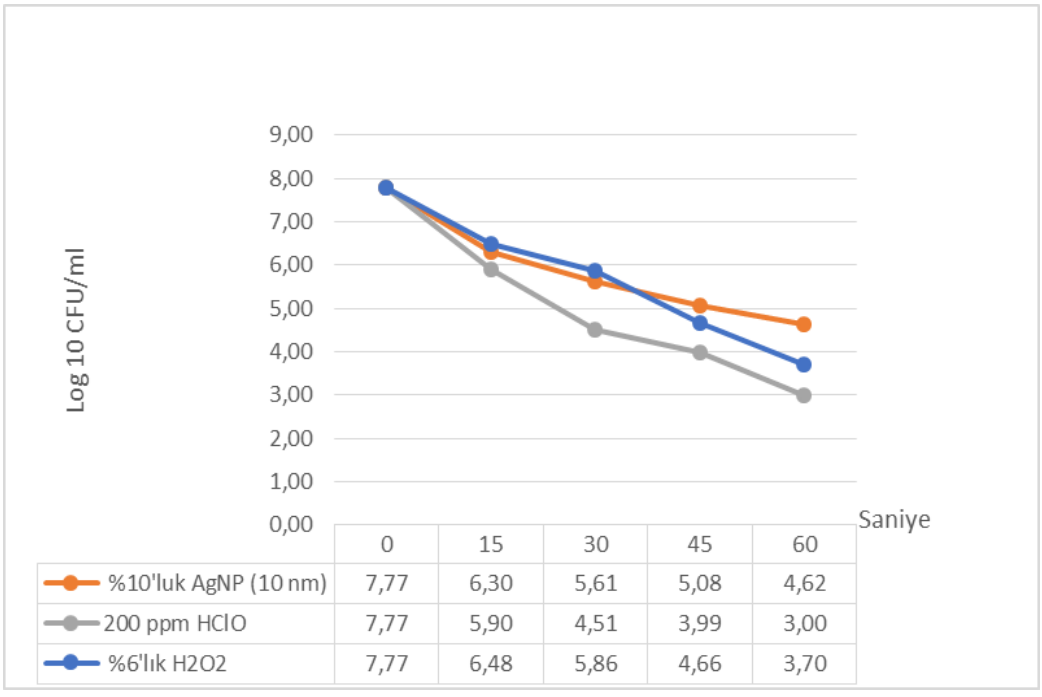
E. coli O157 üzerinde etkisi olması hedeflenen dezenfektana ait ham maddelerin etkisi şekil 4-11'de gösterilmiştir. Bu kapsamda, 1 denemede en etkin azalmanın 30 saniye içerisinde 200 ppm'lik hipokloröz asit tarafından yapıldığı gözlemlenmiştir. Uygulamanın birinci dakikasında dezenfektan etkinliği için önemli 4 logaritmik azalma hipokloröz asit ve %6'lık hidrojen peroksit dezenfektanlarda gözlemlenmiştir. Bu denemede %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektan en düşük etkinliği göstermiştir.

Yapılan 2 denemede *E. coli* O157 üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-12'de gösterilmiştir. Dezenfektan ham maddelerinin bu denemesinde en iyi etkinlik %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektan tarafından canlı bakteri sayısında 6 logartimik azalma ile sağlanmıştır. 200 ppm'lik hipokloröz asit ve %6'lık hidrojen peroksit dezenfektanlar 1 dakika içinde, %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektan tarafından 45 saniyede 5 logaritmik azalam sağlamıştır.

Yapılan 3 denemede *E. coli O157* üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-13'de gösterilmiştir. Dezenfektan ham maddelerinin bu denemesinde tüm dezenfektan ham maddeleri 45. saniyede 5 ve 1 dakika içinde 6 logaritmik azalma sağlamışlardır. %6'lık hidrojen peroksit ilk 15 saniye içinde canlı sayısında 2,26 logaritmik azalma sağlamıştır.

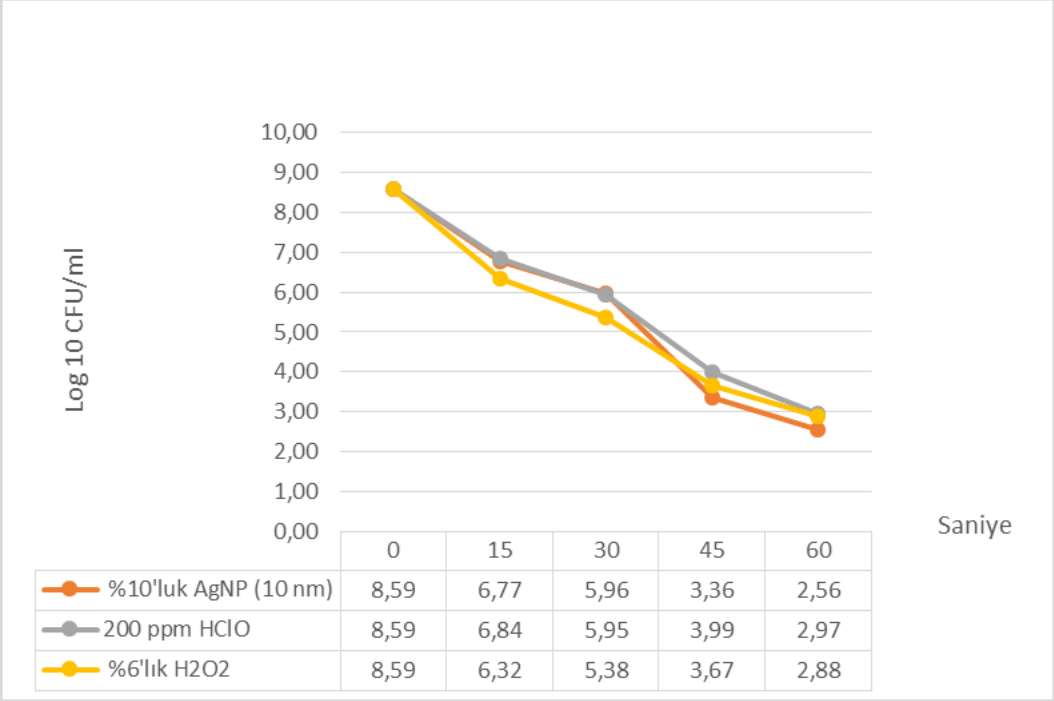
Yapılan 4. denemede *E. coli O157* üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-14'de gösterilmiştir. Dezenfektan ham maddelerinin bu denemesinde tüm dezenfektan ham maddeleri 1 dakika içinde 6 logaritmik azalma sağlamışlardır. %6'lık hidrojen peroksit 45 saniye içinde canlı sayısında 5 logaritmik azalma sağlamıştır.

Yapılan 5. denemede *E. coli* O157 üzerinde ham maddelerin etkisi şekil 4-15'de gösterilmiştir. Bu denemede tüm dezenfektan ham maddeleri 1 dakika içinde 5 logaritmik azalma sağlamışlardır. %6'lık hidrojen peroksit ve 200 ppm hipokloröz asit 30 saniye içinde canlı sayısında 3 logaritmik azalma sağlamıştır. Ayrıca hidrojenperoksit 45 saniye içinde canlı sayısında 4 logaritmik azalma sağlamıştır.



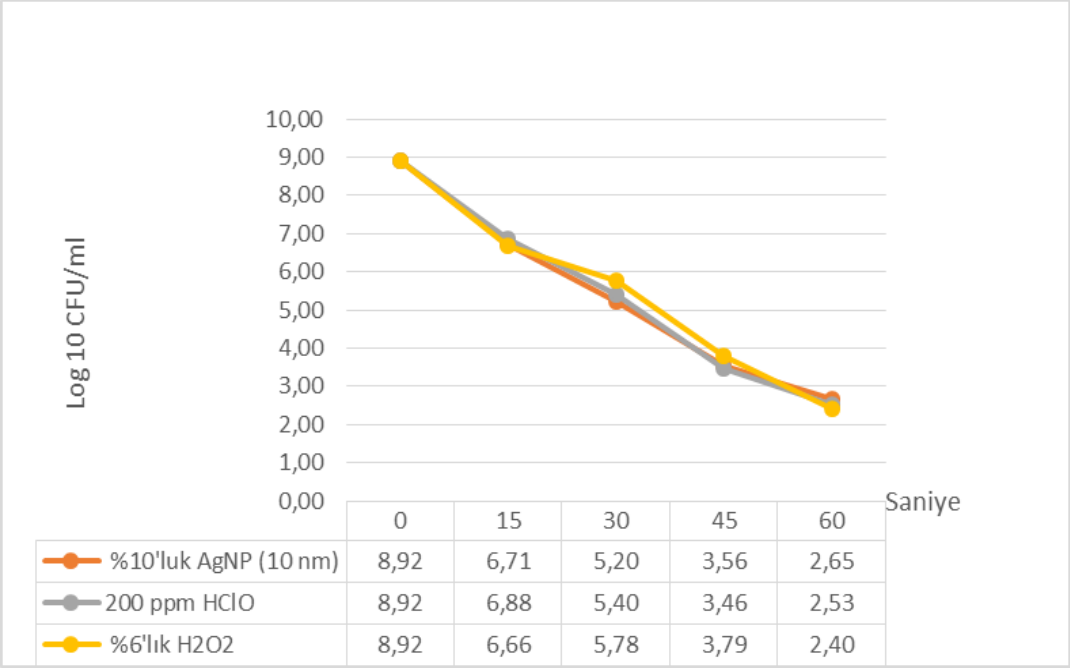
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	7,77	6,30	5,61	5,08	4,62
200 ppm HClO	7,77	5,90	4,51	3,99	3,00
%6'lık H2O2	7,77	6,48	5,86	4,66	3,70

Şekil 4-11. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 1



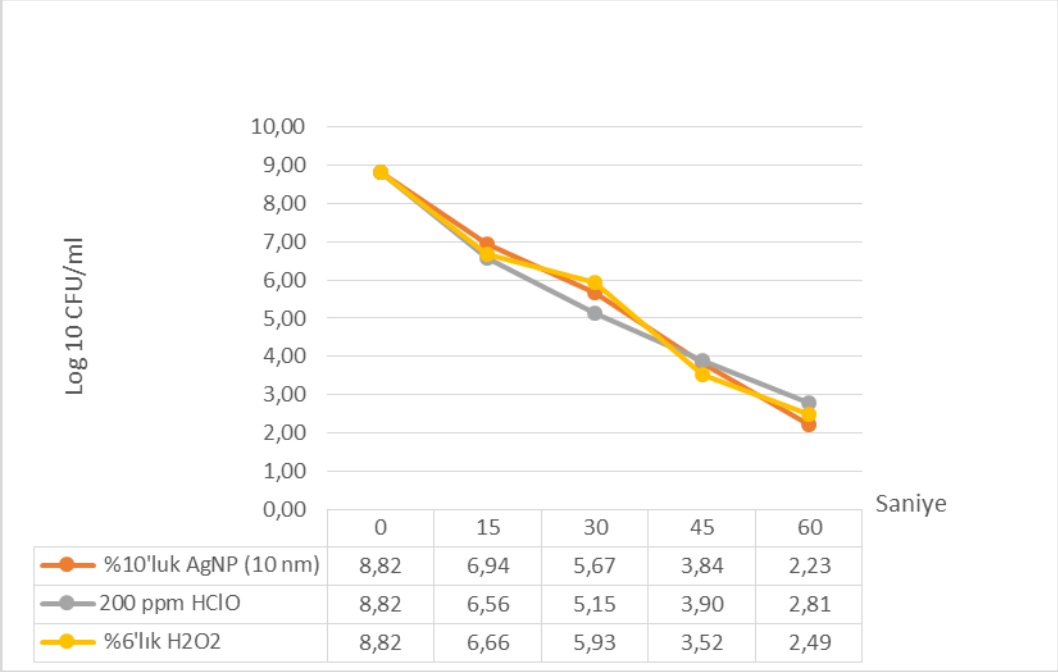
	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,59	6,77	5,96	3,36	2,56
200 ppm HClO	8,59	6,84	5,95	3,99	2,97
%6'lık H2O2	8,59	6,32	5,38	3,67	2,88

Şekil 4-12. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 2

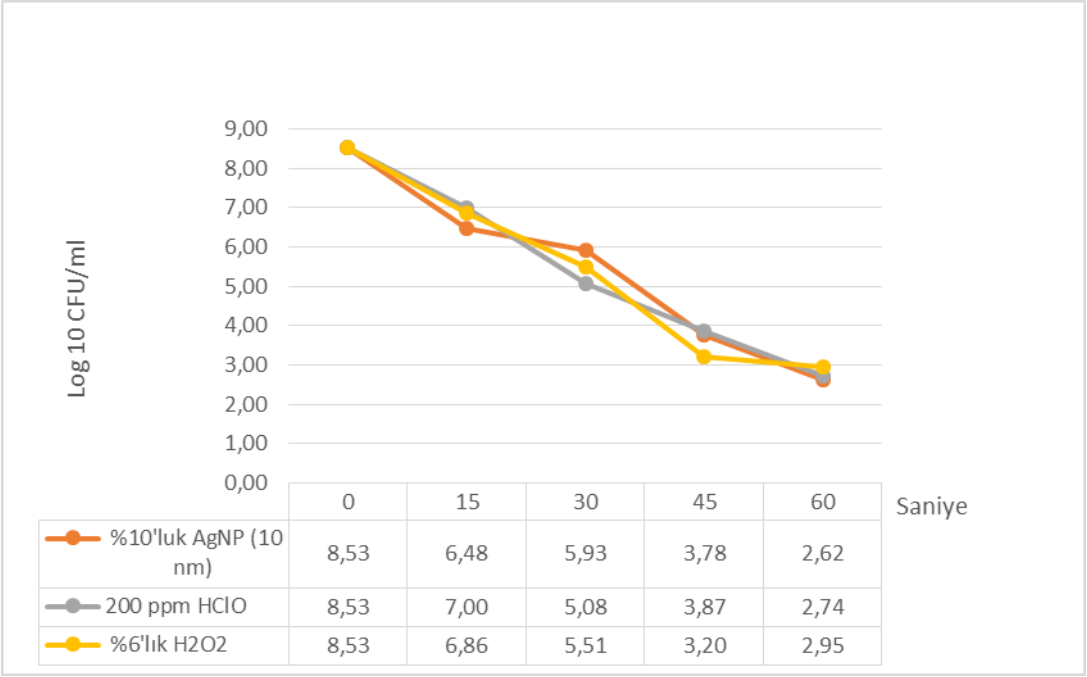


	0	15	30	45	60
%10'luk AgNP (10 nm)	8,92	6,71	5,20	3,56	2,65
200 ppm HClO	8,92	6,88	5,40	3,46	2,53
%6'lık H2O2	8,92	6,66	5,78	3,79	2,40

Şekil 4-13. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 3



Şekil 4-14. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 4



Şekil 4-15. *E. coli* O157 üzerinde dezenfektan ham madde etkinlik denemesi 5

Tüm dezenfektan ham maddeleri en yüksek etkinliği *E. coli* O157 üzerinde göstermişlerdir. *S.* Enteritidis ve *L. monocytogenes* ile yapılan denemelerde maksimum 5 logaritmik azalma sağlanmasına karşın *E. coli* O157 üzerinde yapılan denemelerde tüm dezenfektan ham maddeleri canlı hücre sayılarında 6 logartimik azalma sağlamıştır. Ayrıca Ag NP'lerin en fazla azalmayı sağladığı bakteri de *E. coli* O157'dir.

4.2 Endüstriyel kullanıma uygun olarak hazırlanan ve gümüş nanopartikül içeren dezenfektanları

Endüstriyel kullanıma uygun olarak hazırlanan dezenfektanlar ve içerikleri tablo 4-1'de bildirilmiştir. Farklı boyutlarda (10 nm, 20 nm ve 100 nm) Ag NP kullanılarak 8 farklı dezenfeksiyon formülasyonu oluşturulmuştur. Karışımlara Ag NP dışında hidrojenperoksit, hipokloröz asit ve alkol ilave edilmiştir.

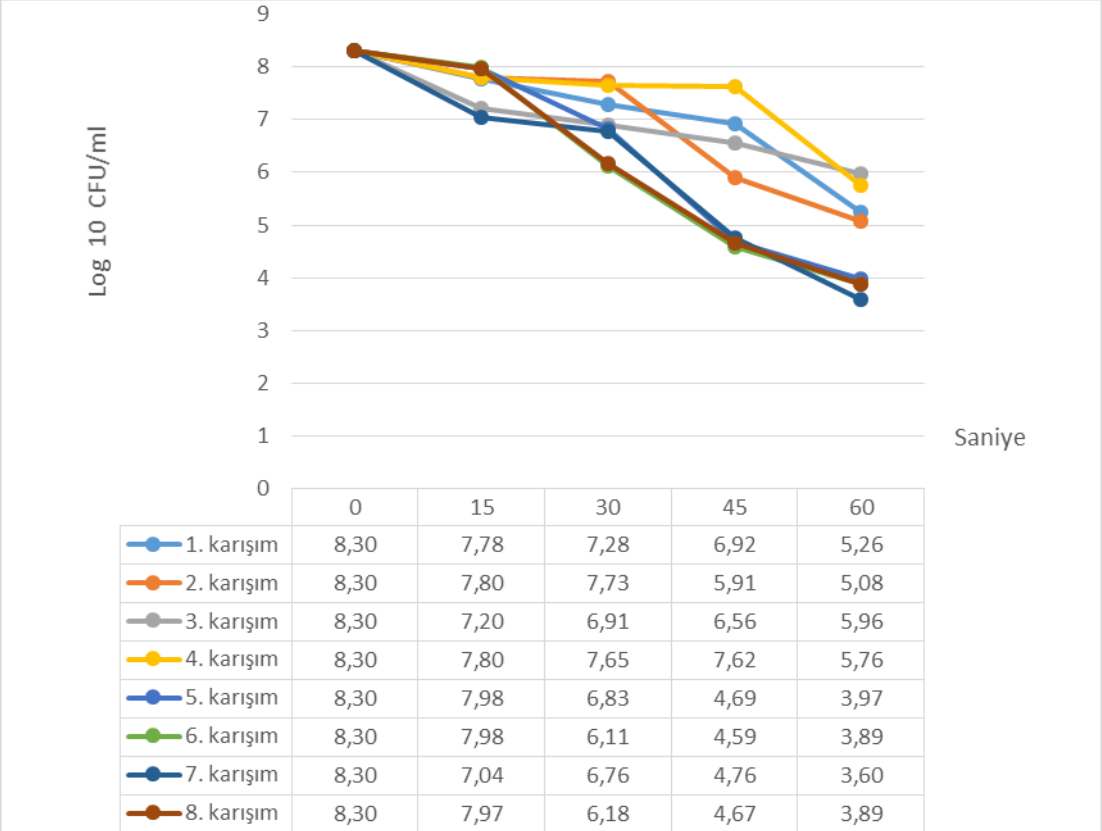
Tablo 4-1. Dezenfektan karışımları formülasyonları tablosu

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Ag NP (10 nm)	%10		%20		%10			
Ag NP (20 nm)		%10		%20	%10			
AgNP(100 nm)						%10	%20	%10
HClO	200 ppm	0	200 ppm	0	0	0	200 ppm	0
H_2O_2	0	%6	0	%6	0	0	0	%6
Alkol %96	0	0	0	0	%75	%75	%75	%75

Endüstriyel kullanıma uygun olarak hazırlanan dezenfektan karışımları *Salmonella* Enteritidis, *L. monocytogenes ve E. coli* O157 bakterilerinin biyofilmleri oluşturularak üzerinde test edilmiştir.

4.2.1 *Salmonella* Enteritidis biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri

Salmonella Enteritidis biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezenfektan karışımına maruz bırakılmıştır. *Salmonella* Enteritidis biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 7. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 4,7 logaritmik azalma sağlamıştır. Karışımında alkol bulunan 5, 6, 7 ve 8. dezenfektan karışımları biyofilmdeki canlı hücre sayısında 4 logaritmik azalma sağlamıştır. 3. ve 4. karışımlar biyofilmde canlı sayısında sadece 2 logaritmik azalma sağlamıştır. 1. ve 2. karışımlar 3 logaritmik azalma sağlamıştır (Şekil 4-16).

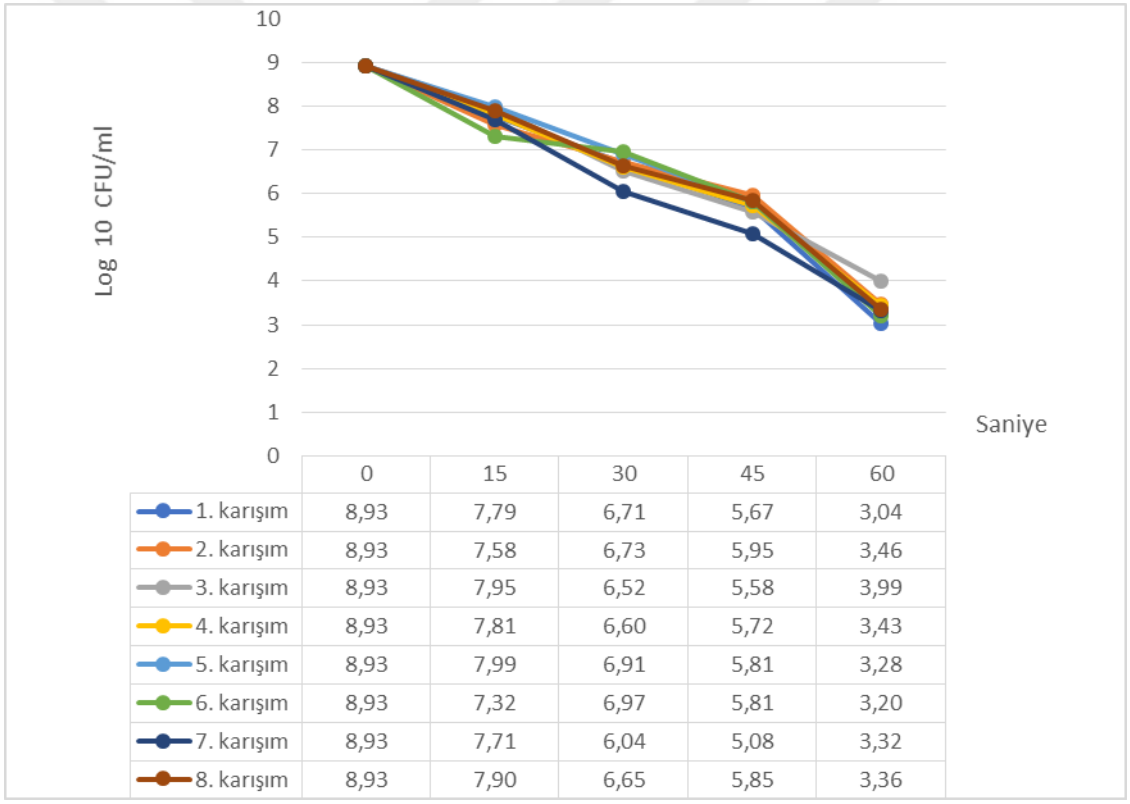


	0	15	30	45	60
1. karışım	8,30	7,78	7,28	6,92	5,26
2. karışım	8,30	7,80	7,73	5,91	5,08
3. karışım	8,30	7,20	6,91	6,56	5,96
4. karışım	8,30	7,80	7,65	7,62	5,76
5. karışım	8,30	7,98	6,83	4,69	3,97
6. karışım	8,30	7,98	6,11	4,59	3,89
7. karışım	8,30	7,04	6,76	4,76	3,60
8. karışım	8,30	7,97	6,18	4,67	3,89

Şekil 4-16. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının *S.* Enteritidis biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma

4.2.2 *L. monocytogenes* biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri

L. monocytogenes biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezenfektan karışımına maruz bırakılmıştır. *L. monocytogenes* biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 1. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 5,9 birimlik logaritmik azalma sağlamıştır. *L. monocytogenes* biyofilmi üzerinde test edilen dezenfektan karışımları, 3 karışım dışında 5 logaritmik azalma sağlamışlardır. 3 dezenfektan karışımı biyofilmdeki canlı hücre sayısında 4 logaritmik azalma sağlamıştır.

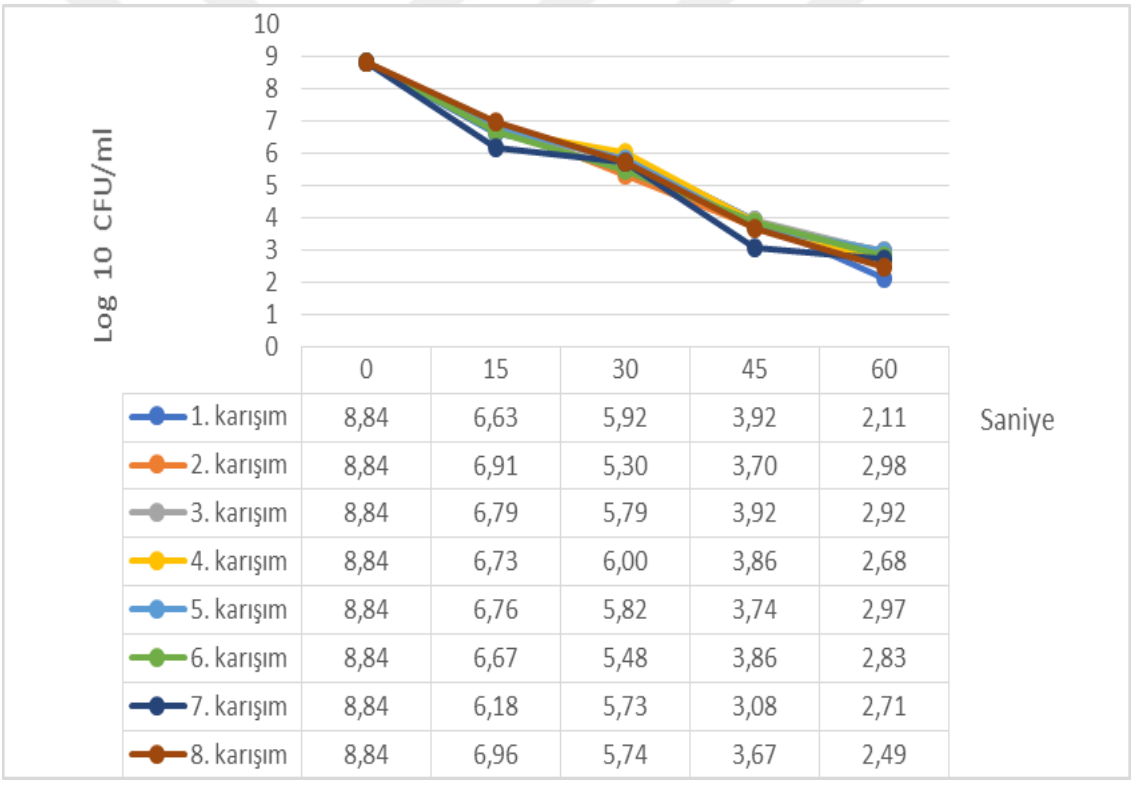


	0	15	30	45	60
1. karışım	8,93	7,79	6,71	5,67	3,04
2. karışım	8,93	7,58	6,73	5,95	3,46
3. karışım	8,93	7,95	6,52	5,58	3,99
4. karışım	8,93	7,81	6,60	5,72	3,43
5. karışım	8,93	7,99	6,91	5,81	3,28
6. karışım	8,93	7,32	6,97	5,81	3,20
7. karışım	8,93	7,71	6,04	5,08	3,32
8. karışım	8,93	7,90	6,65	5,85	3,36

Şekil 4-17. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının *L. monocytogenes* biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma

4.2.3 *E. coli* O157 biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri

E. coli O157 biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezenfektan karışımına maruz bırakılmıştır. *E. coli* O157 biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 1. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 6,72 birimlik logaritmik azalma sağlamıştır. *E. coli* O157 biyofilmi üzerinde test edilen dezenfektan karışımlarından, 1, 4, 6, 7, 8 numaralı karışımlar 6 logaritmik azalma sağlamışlardır. 2, 3 ve 5 numaralı dezenfektan karışımları biyofilmdeki canlı hücre sayısında 5 logaritmik azalma sağlamıştır.

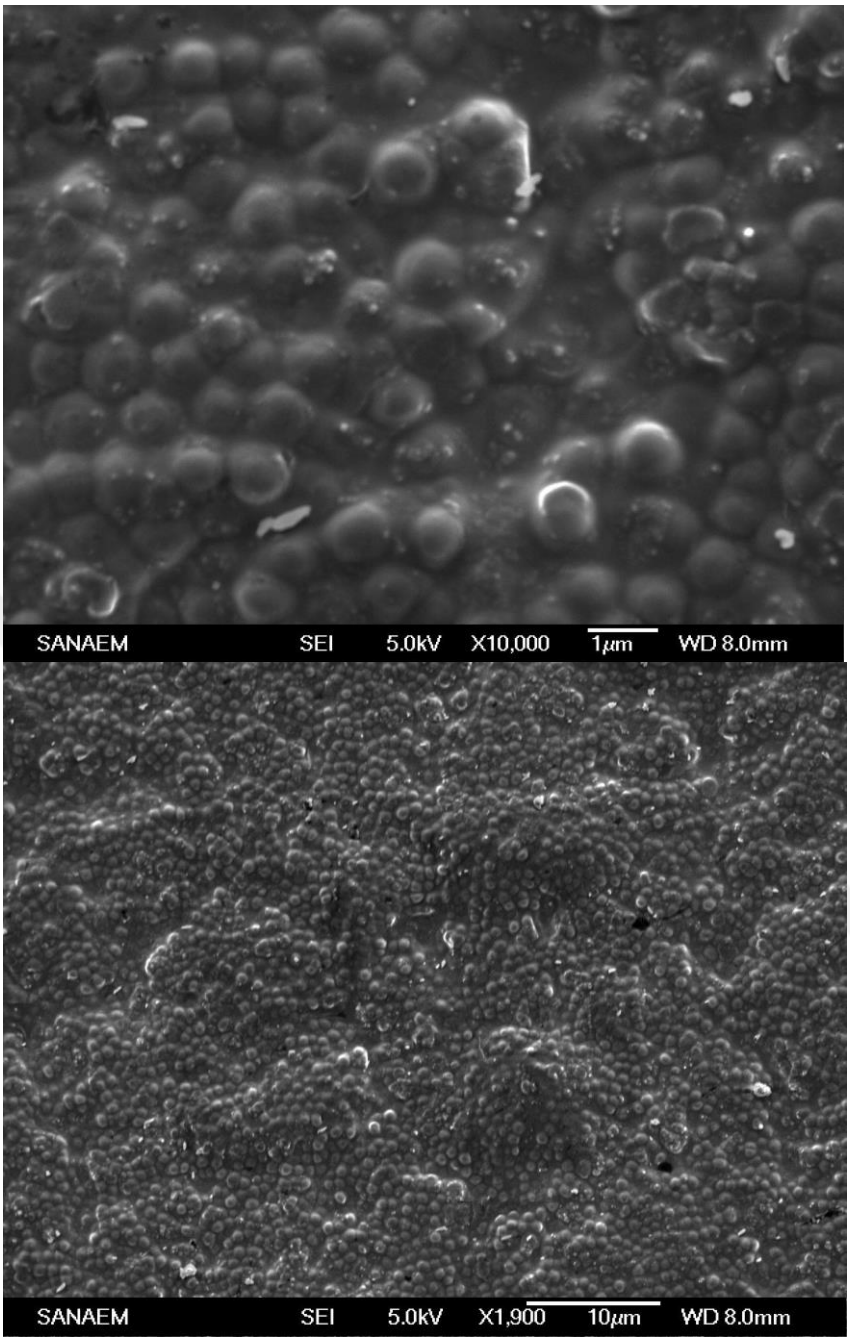


	0	15	30	45	60
1. karışım	8,84	6,63	5,92	3,92	2,11
2. karışım	8,84	6,91	5,30	3,70	2,98
3. karışım	8,84	6,79	5,79	3,92	2,92
4. karışım	8,84	6,73	6,00	3,86	2,68
5. karışım	8,84	6,76	5,82	3,74	2,97
6. karışım	8,84	6,67	5,48	3,86	2,83
7. karışım	8,84	6,18	5,73	3,08	2,71
8. karışım	8,84	6,96	5,74	3,67	2,49

Şekil 4-18. Ag NP katkılı dezenfektan karışımlarının E. coli O157 biyofilmi canlı hücre sayında oluşturduğu azalma

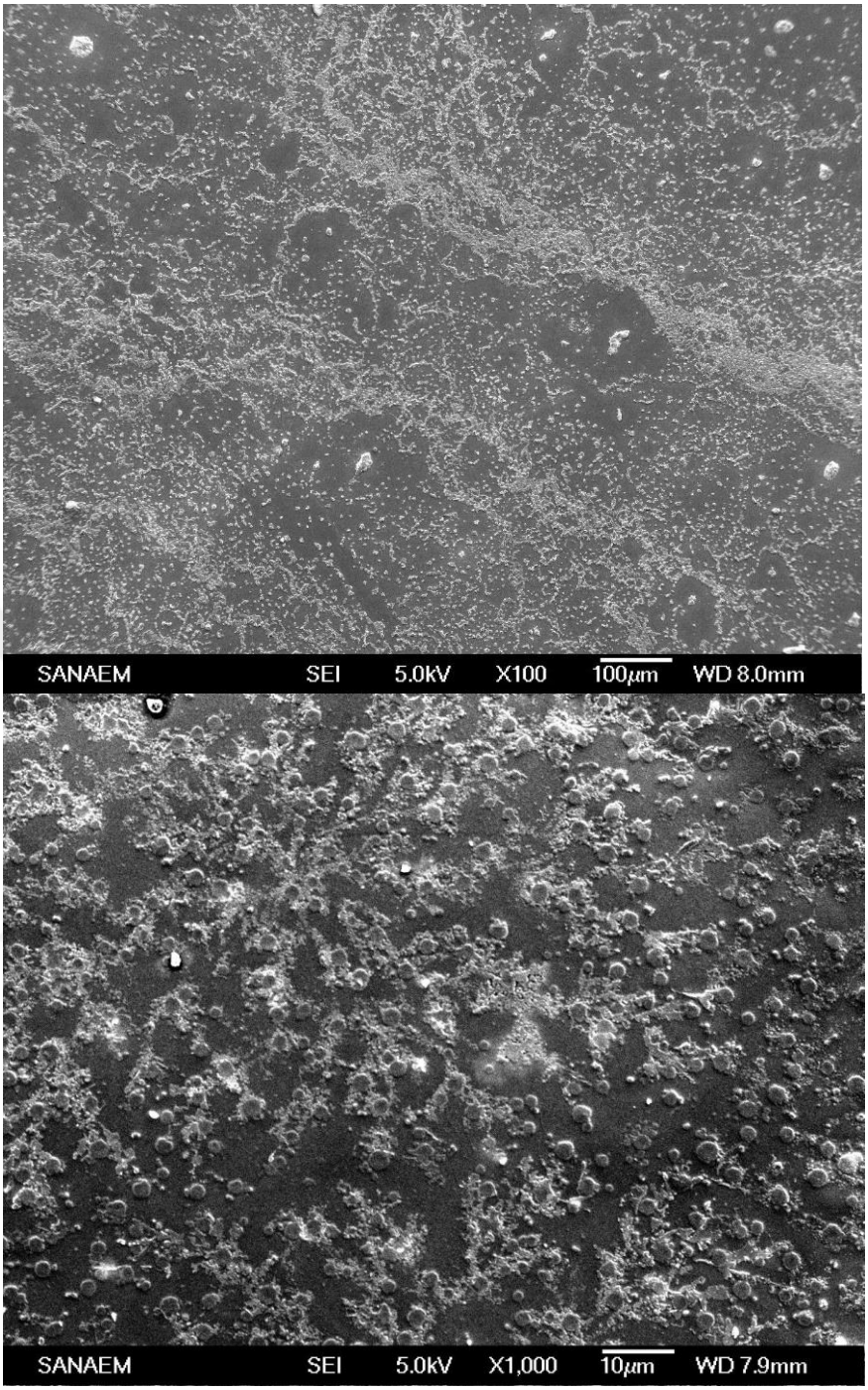
4.3 Biyofilmin morfolojik incelemesi

Test edilen dezenfektan karışımlarının bakteri suşları üzerindeki antibiyofilm etkisi SEM analiz ile saptanmıştır. Görüntüler etkinin iyi anlaşılabilmesi için farklı büyütme oranlarında *E. coli* O157 bakteri biyofilmi üzerinde dezenfektan uygulaması öncesi ve sonrası alınmıştır. SEM analizinde şekil 4-19'da görülen tipik *E. coli* O157 biyofilm yapısı gözlenmektedir. Ag NP içeren dezenfektan eklenmeden oluşan *E. coli* O157 kültürleri, pürüzsüz hücre yüzeyleri ile beklenen normal hücresel morfolojiyi sergilemektedir. Yoğun şekilde yüzeye tutunmuş yer yer mantar yapısı oluşumu açıkça görülmektedir.



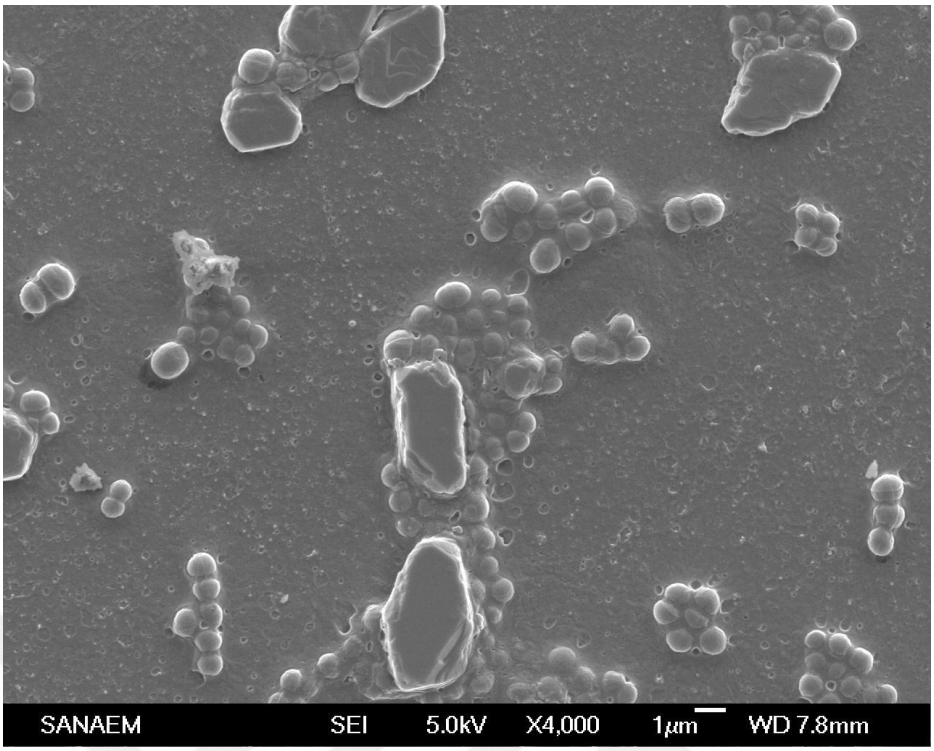
Şekil 4-19. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması öncesi biyofilmin SEM görüntüleri

Büyüme koşullarının aynı olduğu ancak Ag NP içeren dezenfektan varlığında; *E. coli* O157 (Şekil 4-20 ve 21) hücrelerinin morfolojilerinde değişiklikler olduğu ve Ag NP'lerin yüzeylerde bakteri kolonizasyonunu engellediği gözlemlenmiştir. Bakteri hücreleri şişerek bölünmeyi durdurmuşlardır ve yüzeylerde yayılımları azalmıştır. Canlı bakteri hücrelerinin sayısı önemli ölçüde azalarak üç boyutlu bozulmuştur.

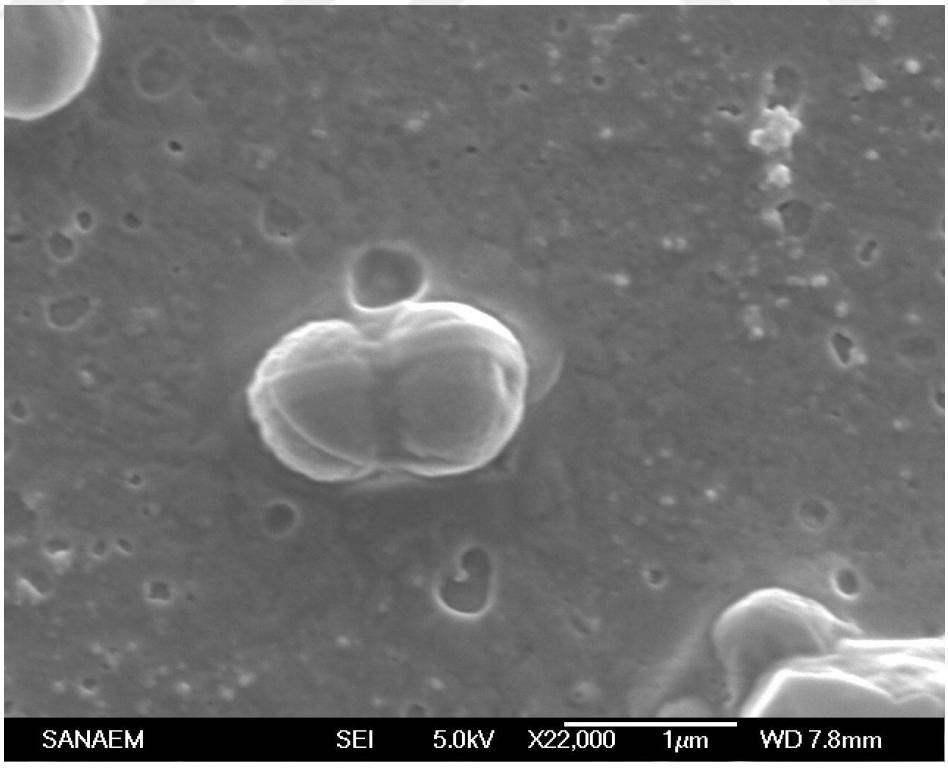


Şekil 4-20. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilmin ve yüzeyin SEM görüntüleri

Şekil 4-22'de Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilm içerisindeki *E. coli* O157 bakteri hücrelerinde oluşan hasar ve bölünmenin nasıl engellendiği gözlemlenmiştir. Kolonileşme sekteye uğramış ve biyofilm parçalanmıştır.

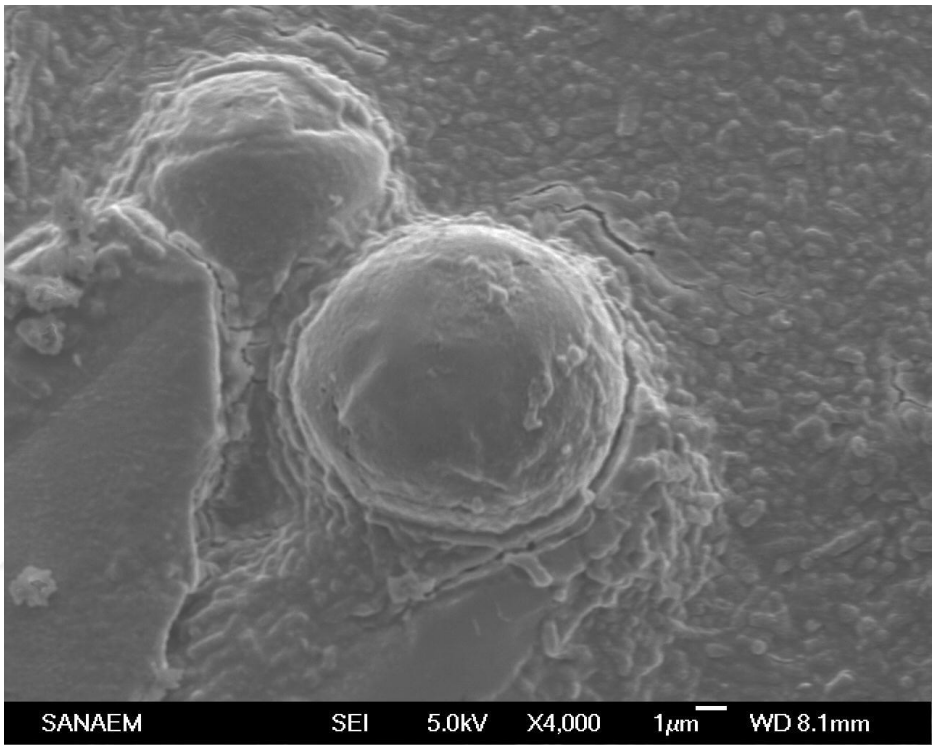


Şekil 4-21. Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilmin SEM görüntüsü



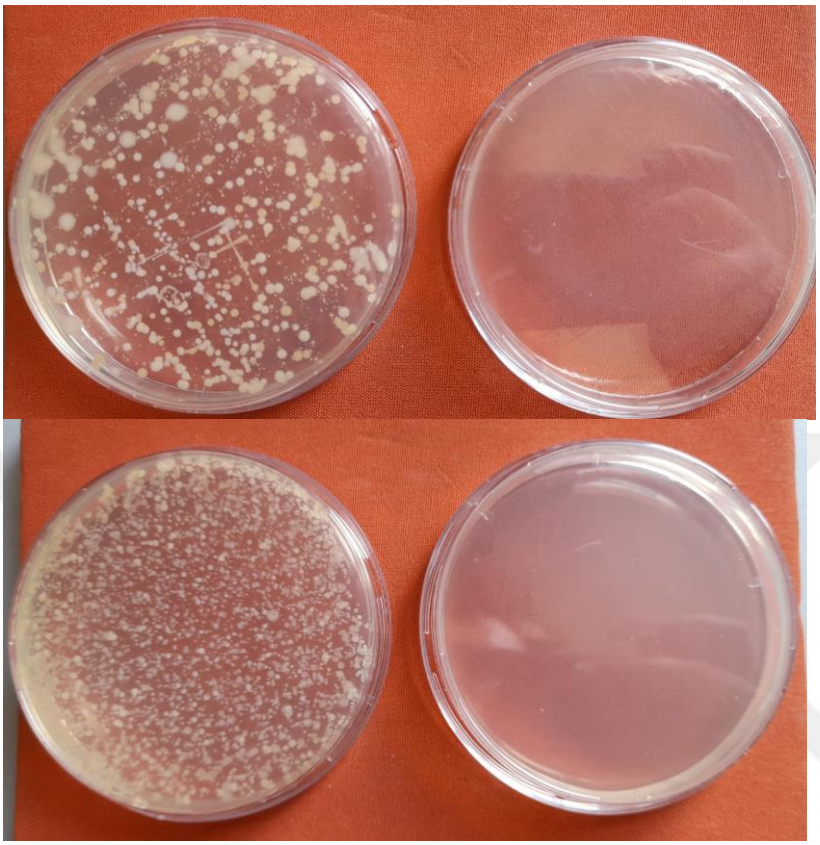
Şekil 4-22. Biyofilmdeki *E. coli 0157* bakterisinin bölünmesinin engellenmesinin SEM görüntüsü

Ag NP içeren 1 numaralı dezenfekten karışımı uygulanmış yüzeyde gümüş nanaopartiküllerin yüzey ve şekil morfolojisinin SEM'de kaydedilen görüntüsü şekil 4-23'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan nanopartiküller küresel yapıda ve 10 nm büyüklüğündedir. Gümüş nanopartikül yüzeylerinin pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4-23. Dezenfektan içindeki gümüş nanopartikülün görüntüsü

4.4 Oluşturulan gümüş nanopartikül içeren dezenfektan karışımlarının restoranlarda denemeleri



Şekil 4-24. PCA agarda görülen toplam mezofilik aerobik bakteri koloni sayılarının yüzey alanına oranı (log/$_{CFU/cm^2}$) ve koloni sayımının yapıldığı petri görüntüleri

Toplam aerobik mezofilik bakterilerinin koloni morfolojileri şekil 4-24'de görülmektedir. 2 ve 4. dezenfektan uygulaması sonrası üremenin en fazla azaldığı gözlemlenmiştir.

Restoran mutfaklarındaki yüzeylerden alınan ve dezenfektan etkinliği gösteren yüzey swabı numunelerinin canlılık oranı sonuçları tablo 4.2'de gösterilmiştir. Çalışmanın yapıldığı dönem, Covid 19 pandemi kapanma dönemi olan 2021 Şubat ayı, sıcaklık değerlerinin düşük olduğu bir dönemde ve restoranlar sadece paket servis olarak hizmet vermektedir. Bu çalışmada yüzeylerde maksimum 10^3 seviyelerinde üreme gözlemlenmiştir. 1., 2. ve 4. dezenfektan karışımlarının 1 logaritmik azalma sağladığı tespit edilmiştir.

Tablo 4-2 Restoran mutfaklarında sık kullanılan yüzeylerde dezenfektan karışımının etkinliği

Uygulama yeri	**R 1**	**R 1**	**R 1**	**R 1**	**R 2**	**R 2**	**R 2**	**R 2**	**R 3**	**R 3**	**R 3**	**R 3**	**R 4**	**R 4**	**R 4**	**R 4**
Uygulama yapılan yüzey	Kesme tablası	Kesme tablası	Kesme tablası	Kesme tablası	Bıcak	Bıcak	Bıcak	Bıcak	Kesme tablası	Kesme tablası	Kesme tablası	Kesme tablası	Terazi	Terazi	Terazi	Terazi
Kullanılan dezenfektan Karışımı	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4
Dezenfektansız yüzey	$2,4x10^3$	$1,05x10^3$	$1x10^2$	$3x10^1$	0	$1x10^1$	$5x10^2$	5	$2,11x10^2$	$4,4x10^1$	$2,2x10^1$	$2,8x10^3$	$4,4x10^1$	0	$3,5x10^1$	$5x10^1$
Dezenfektan uygulanan yüzey	$2,6x10^2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$1,8x10^1$	0	0	0	0
Uygulama yeri	**R 5**	**R 5**	**R 5**	**R 5**	**R 6**	**R 6**	**R 6**	**R 6**	**R 7**	**R 7**	**R 7**	**R 7**	**R 8**	**R 8**	**R 8**	**R 8**
Uygulama yapılan yüzey	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye	Evye
Kullanılan dezenfektan Karışımı	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4	Dez 1	Dez 2	Dez 3	Dez 4
Dezenfektansız yüzey	0	$1,02x10^2$	$4,4x10^1$	0	$2,31x10^2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dezenfektan uygulanan yüzey	0	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Restoran

Dez: Dezenfektan karışımı

No:Baslangıç bakteri sayısı ($log/_{CFU/cm^2}$)

N: 1 dakika dezenfektan uygulamasıda yüzeyde canlı kalan bakteri sayısı (Log_{CFU/cm^2})

5 TARTIŞMA

Temizlik ve dezenfeksiyon aşamasında yok edilemeyen ve gıdalara bulaşan dirençli patojenik bakteriler, gıda endüstrisi için bir önemli bir tehdit oluşturarak halk sağlığı için ciddi sonuçlara yol açabilmektedir. Patojen bakterilerin biyofilm ve planktonik halleri üzerindeki etkinlikleri test edilen dezenfektanları kapsayan pek çok bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle biyofilm içindeki bakterilerin dezenfektanlara karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Biyofilmdeki hücre dışı polimerik matris yapısı ve içindeki maddeler, sınırlı besin bulunması ya da dezenfektanların hücrelere ulaşmasının engellenmesi gibi pek çok faktörün bu direnci oluşturduğu düşünülmektedir. Üreme ortamı Ph'sı, sıcaklığı ve organik madde miktarı direnç gelişmesini ekileyebilmektedir (Kartal 2007). Ag NP'lerin yüksek etkinlik, hızlı etki yapan, koku giderici, toksik olmayan, uyarıcı olmayan, alerjik olmayan, toleranssız ve hidrofilik yapıda olduğu için bakteri direnci için çok etkili olduğu belirtilmektedir (Nia 2007). Patojen bakteri ve diğer zararlı mikroorganizmaların yok edilmesi için organik asitler, hidrojen peroksit, sodyum bikarbonatlar, sodyum hipoklorit vb. birçok kimyasal bileşik kullanılmıştır. Ancak tüm bunların daha az çözünürlük, ürüne doğrudan uygulama imkanı olmaması, yüksek maliyet, toksisite gibi kullanım sınırlaması vardır (Hegarty ve ark. 2007). Araştırmamızda Ag NP'lerin özellikleri nedeni ile endüstriyel biyosidlere alternatif ya da kombine edilerek kullanımı ile sinerjik etkisi incelenmiştir.

EN 13697'ye göre (Anonim 2001) bir dezenfektan bakterisit etkinliği için, temiz ve kirli yüzeylerde 4 logaritmik azalma, süspansiyon testinde ise (EN 1040) 5 logaritmik azalma sağlamalıdır (Anonim 1997). Biyofilmlere karşı hangi tip dezenfektanların en etkili olduğunu belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, muhtemelen test edilen biyofilmler, yöntemler ve dezenfektanlardaki farklılıklar nedeniyle çelişkilidir (Belessi, Gounadaki, Psomas ve Skandamis 2011; Cruz ve Fletcher 2012). Møretrø ve ark. (2009) pelikül testi, süspansiyon testi ve Avrupa yüzey testi EN 13697:2001 gibi farklı test yöntemleri kullanan dezenfektanların

etkinliğindeki farklı sonuçlar alıanabileceğini göstermiştir. Bu farklılık, biyofilm oluşturma yöntemindeki ve özellikle biyofilm oluşumu için mevcut yüzey alanındaki farklardan kaynaklanabilmektedir.

Çalışmamızda dezenfektan hammaddeleri değerlendirlirken hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve gümüş nanopartikül (Ag NP) çözeltileri ayrı ayrı gıda patojenleri olan *Salmonell*a Enteridis, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157 üzerinde test edilmiştir.

Salmonella Enteridis ile yapılan çalışmada tüm dezenfetanlarının bu bakteri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan 5 ayrı denemede 60 saniye içinde en az bir defa her dezenfektan tarafından 5 logarimik azalma sağlanmıştır. Ve her dezenfektan hammaddesi tarafından 4 logaritmik azalma sağlanmıştır. Faklı çalışmalarda Møretrø ve ark. (2009) ile Condell ve ark (2012) çalışmalarında gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan biyositler olan HClO ve H_2O_2'in planktonik *Salmonella* suşlarına karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *Salmonella* Enteridis biyofilmleri, büyüme ortamına daha küçük bir miktarda inoküle edilmelerine rağmen, planktonik muadillerine kıyasla biyosit formülasyonlarına karşı artan bir tolerans göstermişlerdir. Bu biyofilmlerdeki canlı hücreler için daha fazla temas süresi ve konsantrasyonda biyosit kullanıması gerekmiştir (Condell ve ark 2012). Molina-González ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada mimimum $0{,}43 \pm 0{,}04$ mg /ml konsantrasyondaki sodiumhipokloritin su ile karıştırılması ile elde edilen HClO'nun *Salmonella* Enteridis üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Zarei ve ark.(2014) yaptıkları çalışmada gümüş nanopartiküllerin *Salmonella* suşlarını da kapsayan gıda patojenleri üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Ag NP'lerin *Salmonella* türleri üzerinde orta derecede bakterisidal etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Prema ve Raju 2009). Diğer bir çalışmada boyutu 10 nm altındaki Ag NP'lerin *Salmonella typhi* üzerinde mükemmel antibiyotik etki gösterdiği belirtilmiştir (Song ve ark. 2006).

Yaptığımız çalışmada biyofilm yapısına katılmamış *Salmonella* Enteridis bakterisi üzerinde H_2O_2 ve HCIO'nun 60 saniye içinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda dezenfektan temas süresinin artışının Ag NP dezenfektan etkisini arttırdığı tepsit edilmiştir (Chamakura ve ark. 2011). Daha uzun süreli temas sağlanan bir çalışmada daha etkin sonuçlar elde edilebilir.

Çalışmamızda ikinci olarak *Listeria monocytogenes* üzerinde ham maddelerin etkisi incelenirken yapılan 5 denemenin tamamında kullanılan dezenfektan ham maddelerinden minimum 3 logartimik azalmayı sadece %10'luk 10 nm Ag NP dezenfektan sağlamıştır, tüm dezenfektanlar 4 denemede en az 4 logaritmik azalma ve en az bir denemede canlı hücre sayısında 5 logaritmik azalma sağlamışlardır.

Mohammed ve Abdel Aziz (2019) yaptıkları bir çalışmada %3'lük ve %5'lik H_2O_2 ve farklı boyutlarda Ag NP içeren dezenfektan karışımlarını *L. monocytogenes* üzerinde etkinliğini test etmişlerdir. *L. monocytogenes* %5'lik H_2O_2 ve farklı boyutlarda Ag NP içeren dezenfektan karışımı direnç geliştirememiş ve çok güçlü bakterisidal etki sağlamıştır.

Yun ve ark. (2012) %1'lik, 6'lık ve 10'luk H_2O_2 dezenfektanlarının *L. monocytogenes* planktonik ve biyofilm içindeki suşları üzerindeki etkinliğini test etmişlerdir. Yapılan çalışmada %1'lik dezenfektanın sadece plantonik suşlar üzerinde etkili olduğu, %6'lık ve %10'luk H_2O_2 dezenfektanların ise hem biyofilm hem de plantonik hücreler üzerinde bakterisal etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Elektrolitik olarak oluşturulan hipokloröz asitin dezenfektan olarak kullanıldığı bir çalışmada *L. monocytogenes*'e karşı etkisi hem bakterinin aşılandığı sosislerde hem de bu bakteriler ile enfekte edilen dilimleme bıçaklarında test edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda dezenfeksiyon etkisinin sosislerde canlı hücre sayında anlamlı bir azalma görülmemiş, dilimleme bıçaklarında ise canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Veasey ve Muriana 2016). Daha önce klor kullanılarak yapılan bir çalışmada 200 ppm klor dezenfektan kullanımı ile taze meyve sebzelerde *L. monocytogenes* sayısında 2 log CFU/g azalma sağlannmıştır (Zhang ve Farber 1996).

Aarnısalo ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmada bir et işletmesinde içinde H_2O_2, NaClO (sodyumhipoklorit) ve alkol gibi dezenfektaları da içeren dezenfektan karışımlarının etkinlikleri test edilmiştir. Süspansiyon halindeki tüm *L. monocytogenes* suşları tüm dezenfektanlar tarafından 30 saniye içinde etkili bir şekilde azaltılmıştır (5 log) .

Önceki çalışmalar Ag NP'lerin *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Tamayo ver ark 2014). Yapılan bir diğer çalışmada Ag NP solüsyonunun konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığı ve Ag NP'lerin biyosidal davranışının, *L. monocytogenes* ile artan inkübasyon süresi ve Ag NP'lerin konsantrasyonunun yükseltilmesi ile arttığı gösterilmiştir (Alsammarraie ve ark 2018).

Çalışmamızda dezenfektan hammadelerinin *E. coli* O157 üzerinde yapılan 5 denemeden 2'sinde %6'lık H_2O_2 ve 200 ppm hipokloröz asit, yapılan 3 denemede %10 'luk 10 nm Ag NP, 6 logaritmik azalma sağlamışlardır. Kullanılan her 3 dezenfektan hammaddesi *E. coli* O157 üzerinde başarı sağlamıştır.

Taylor ve ark (2001) endüstride kullanılan farklı dezenfektanlar ile yaptıkları bir çalışmada sodyumhipokloritin *E. coli* O157:H7 üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Bir dezenfektan karışımı hazırlamak üzere hammadde olarak kullanılan elektrolize sudan elde edilen hipokloröz asitin *E. coli* 0157 inoküle edilmiş dana eti üzerinde hiçbir etki göstermediği bildirilmiştir (Cap ve ark. 2019). Faklı bir çalışmada hafif asidik hipokloröz asitli su (50 veya 100 ppm klor içeren, pH 6) sıvı içinde *E. coli* ve *Salmonella Infantis*'i maruziyetten sonraki 5 saniye içinde saptanabilir seviyelerin ($\leq$2,6 $\log_{10}$ CFU/mL) altına inaktive edebilmiştir (Hakim ve ark. 2016). Başka bir çalışmada asidik elektrolize su şeklinde uygulanan hipokloröz asit plastik mutfak kesim tezgahı dezenfeksiyonu için kullanılmış ve *E. coli* O157:H7 popülasyonunun 5 log CFU/100 cm^2'den daha fazla azaldığı gözlemlenmiştir (Venkitanarayanan ve ark 1999).

Bir çalışmada, H_2O_2 buharının *S. Typhimurium, E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in marul üzerindeki etkinliği ve marul kalitesine etkisi araştırılmıştır. Marul, her patojenden suş içeren bir kokteyl ile aşılanmış ve ardından 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 dakika boyunca %0, 1, 3, 5 ve %10 konsantrasyonda buharlaştırılmış H_2O_2 ile muamele edilmiştir. Özellikle 10 dakikalık buharlaştırılmış %10 H_2O_2 uygulaması, maruldaki üç patojeni azaltmak için en etkili kombinasyon olduğu saptanmıştır. Maruldaki *S. Typhimurium, E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes'in* indirgeme seviyeleri sırasıyla 3,12- 3,15 ve 2,95 $\log_{10}$ CFU/g olarak tespit edilmiştir (Back ve ark 2014). Diğer bir çalışmada, %5'lık H_2O_2 ile yapılan uygulama ile 5 ve 10 dakikada canlı ama kültürde üretilemeyen *Salmonella typhimurium* (6,9 log) ve *E. coli* (6,3 log) üzerinde etkin bir azalma sağlamıştır (Sheldon ve Brake 1991). H_2O_2'in %5'lik konsantrayonu ile yumurtalar üzerinde yapılan uygulamada yumurta kabuğunda canlı hücre sayısında 5 logartimik azalma sağlanmıştır (Sheldon ve Brake 1991).

Ag NP'ler *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etkisini gösteren çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır (Sondi ve Salopek Sondi 2014). *E coli* O157 üzerinde yapılan bir çalışmada Ag NP'lerin konsantrasyonunun artmasıyla koloni oluşturan canlı bakteri sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Bakterilerin 5 mg/L konsantrasyonda Ag NP'lere maruz kalması bakteri üremesini %50 oranında engellemiştir. 12,5 mg/L konsantrasyona sahip Ag NP'lerin bakteri üremesini neredeyse tamamen inhibe ettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada, farklı pH ve sıcaklıklar dahil olmak üzere farklı koşullar altında Ag NP'lerin gıda patojeni Gram negatif suşu *E. coli* O157:H7 antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ag NP'lerin antibakteriyel etkisinin, 37°C'de 4°C'dekinden üç kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca asit uygulamasının (pH 2,0) Ag NP'lerin antıbakteriyel aktivitesini zayıflattığını göstermiştir (Xu ve ark. 2012).

Yapılan başka bir çalışmada Ag NP'lerin *E. coli* O157:H7 üzerinde doza bağlı antimikrobiyal etkisinin gözlemlenmediğini belirtmektedir, 6, 12 ve 18 µg/mL Ag NP konsantrasyonu ile çalışılan gruplar için 24 saat inkübasyondan sonra bakteri hücrelerindeki azalma tümünde neredeyse 4 log CFU/mL olarak tespit edilmiştir (Alsammarraie ve ark. 2018).

Ag NP’lerin maya, *E. coli* O157 ve *S. aureus* üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan partiküllerin en büyük etkiyi *E. coli O157* üzerinde yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada Ag NP’lerin mikroorganizmlar üzerindeki etkinliğinin konsantrasyona bağlı olduğu gözlemlenmiştir (Kim ve ark 2007). Bir diğer çalışmada *E. coli*'nin Ag NP'lere enterokok izolatından daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Ali ve ark 2020).

Bizim çalışmamızda da tüm dezenfektan hammaddeleri en yüksek etkinliği *E. coli* O157 üzerinde göstermişlerdir. *Salmonella* Enteridis ve *Listeria monocytogenes* ile yapılan denemelerde maksimum 5 logaritmik azalma sağlanmasına karşın *E. coli* O157 üzerinde yapılan denemelerde tüm dezenfektan hammaddeleri canlı hücre sayılarında 6 logartimik azalma sağlamıştır. Ayrıca çalışmamızda Ag NP’lerin en fazla azalmayı sağladığı bakteri de *E. coli* O157’dir.

40°C'de uygulanan %1,5 laktik asit ve %1,5 H_2O_2 kombinasyonunun, *E. coli O157:H7, Salmonella* Enteritidis ve *Listeria monocytogenes* inoküle edilmiş elma, portakallar, ve domatesler üzerinde yüksek inaktive edici etki göstermiştir (Venkitanarayanan ve ark. 2002). Marula 50 °C'de %2’lik H_2O_2 uygulaması, *E. coli* O157:H7 ve *S.* Enteritidis için 4 log ve *L. monocytogenes* için 3 log popülasyon azalması sağlamıştır (Lin ve ark 2002).

Hipokloröz asitin *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella sp*. gibi birçok patojenik bakteri üzerinde güçlü bakterisit etkileri olduğu bildirilmiştir. Mullerat ve arkadaşları (1995) *Salmonella* Enteridis, *E. coli* O157, *L. monocytogenes* üzerinde 200 ppm sodyumhipoklorit kullanarak yaptıkları çalışmada konsantrasyona bağlı olarak hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler üzerine etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda dezenfektan hammadde testlerinden sonra endüstriyel kullanıma uygun olarak hazırlanan Ag NP içeren dezenfektan karışımları *Salmonella* Enteridis, *L.*

monocytogenes ve *E. coli* O157 bakterilerinin biyofilmleri oluşturularak üzerinde test edilmiştir.

Biyofilm oluşturan bakteriler, gıda işleme ortamlarında tekrarlayan problemlerin kaynağı olduğu bilinmektedir. Biyofilm içinde gömülü halde bulunan bakteriler, planktonik formda yaşayan bakterilere göre antibiyotiklerin, dezenfektanların ve deterjanların etkisine neredeyse bin kat daha toleranslıdır. (Mah ve ark. 2003).

Çalışmamızda *Salmonella* Enteridis biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri incelendiğinde bölümde *Salmonella* Enteridis biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezefenktan karışımına maruz bırakılmıştır. 7 günlük *Salmonella* Enteriditis biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 7. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 4,7 logaritmik azalma sağlamıştır. Karışımında alkol bulunan 5, 6, 7 ve 8. dezenfektan karışımları biyofilmdeki canlı hücre sayısında 4 logaritmik azalma sağlamıştır. 3. ve 4. karışımlar biyofilmde canlı sayısında sadece 2 logaritmik azalma sağlamıştır. 1. ve 2. karışımlar 3 logaritmik azalma sağlamıştır. Buradan alkol ve Ag NP karışımlarının *Salmonella* Enteridis biyofilmleri üzerinde anlamlı bir bakterisid etkisi olduğu söylenebilir. Çalışmada 200 ppm hipokloröz asit ve %20'lik 10 nm boyutlu Ag NP içeren 3. numaralı dezenfektan karışımı sadece 2,34 logaritmik azalma sağlarken 200 ppm hipokloröz asit ve %20'lik 100 nm boyutlu Ag NP içeren ve %75 alkol içeren dezenfektan karışımı en başarılı etkiyi göstererek 4,7 logaritmik azalma sağlamıştır. Literatürde birebir çalışmamızda kullanılan karışım dezenfektanın kullanıldığı makale yada çalışma görülememiştir. Ancak kullandığımız dezenfektan ham maddeleri ve bu ham maddelerin kullanıldığı farklı dezenfektan karışımlarının bakterilerin biyofilmleri üzerine yapılan çalışmaları bulunmaktadır.

Salmonella biyofilmleri dezenfektanlara planktonik formlarından daha fazla rezistans göstermektedir (Somers ve ark, 1994; Joseph ve ark.2001; Wong ve ark. 2010).

Wong ve ark. (2010) çalışmalarında bizim çalışmamızdan farklı olarak 3, 5 ve 7 günlük *Salmonella* biyofilmleri üzerinde 1 ve 5 dakikalık sürelerde farklı dezenfektanlar uygulamışlardır. Biyofilmler üzerinde en az etkiyi %70'lik etanol göstermiştir. *Salmonella* biyofilmleri üzerinde en iyi etkiyi biyofilm yaşının önemi olmaksızın yaşayan bütün hücreleri %100 azaltan sodyumhipoklorid sağlamıştır. Çalışmaya göre biyofilm gideriminde resistans oluşmasına biyofilm yaşının etkisi bulunmamakta, ancak dezenfeksiyon temas süresi ve dezenfektan konsantrasyonu başarılı bir sanitasyon için daha büyük önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda da gümüş nanopartikül sinerjik etki göstermiş olabilir.

Hipokloröz asidin sodyum tuzu olan sodyumhipoklorit, sodyumhidroksit ve benzalkonyumklorid içerikli dezenfektanlarının *Salmonella* Enteriditis'in de dahil olduğu *Salmonella sp.* biyofilmleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmada bu dezenfektanların planktonik halde bulunan bakteri üzerine tamamen etkili olmasına rağmen olgun biyofilmleri yok edemediği gösterilmiştir. Çalışmada bu dezenfektanlardan sadece hipokloröz asit dezenfektanı 48 saatlık biyofilmdeki tüm canlı hücreleri yok edebilmiştir, ancak 72 saatlik biyofilmde kısmı etki yaratmıştır (Corcoran 2014).

Møretrø ve ark (2012) *Salmonella* bakterilerine asidik peroksijen bazlı dezenfektanlar (Virkon S) uygulamasında 4 logaritmik azalma sağlamış, hipoklorit ve benzalkonyum klorür yeterli bakterisidal etki göstememişlerdir. Yüzeylerde daha iyi hayatta kalan *Salmonella* Enteritidis izolatları aynı zamanda asidik koşullarda ve hidrojen peroksit varlığında da daha iyi hayatta kalmışlar ve ısıya karşı gelişmiş tolerans göstermişlerdir (Van Houdt ve Michiels 2010).

Vetsby ve ark. (2009) tarafından yürütülen çalışmada *Salmonella* biyofilmindeki canlı hücre sayısında ne hipoklorit ne de benzalkonyum klorür ile 4 logaritmik azalma sağlananamıştır, istenen azalma kullanılan dezenfektanları sentetik bir furanon ile kombine ederek elde edilmiştir. Biyofilmin klora karşı direnci hala tam olarak anlaşılamamıştır, ancak en azından kısmen biyositin biyofilme nüfuz etmesinin

engellenmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Van Houdt ve Michiels 2010). Solano ve ark. (2002) biyofilm matrisinin *Salmonella* Enteritidis hücrelerini klora karşı korumasına karşın, selüloz eksikliği olan mutantların klor uygulamasına daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda 7 güne kadar olan *S. enterica* biyofilm oluşumu üzerine dezenfektan ürünlerinin etkinliğinde zamana bağlı bir değişiklik görülmemiştir (Møretrø ve ark 2012, Vetsby ve ark. 2009).

Biyosentez yolu ile üretilmiş Ag NP'ler, 2000 $\mu g\ ml^{-1}$ konsantrasyonda içinde *Salmonella* türlerinin de bulunduğu patojenik bakterilerin önceden oluşturulmuş biyofilmlerini parçalama yeteneği sergilemiştir. Ag NP'ler, EPS üzerinde adsorbe edilmeden kalın biyofilm katmanlarına nüfuz ederek, patojenik bakterilerin 24 saatlik biyofilminde %98'e varan bir bozulma sağlamıştır (Gaidhani ve ark. 2013).

Kyaw ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Ag NP'lerin, *S. typhimurium, E. coli, B. subtilis, S. aureus ve P. aeruginosa* biyofilmi oluşumunu 25-50 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda %85 - %100 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca *Salmonella* ve *Pseudomonas* spp. biyofilmlerinin giderimini sağlayabileceklerini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada bir antibiyotik olan İmipenem ve Ag NP'lerin *Salmonella* izolatlarına eklenmesi karşılaştırılmış ve Ag NP'lerin İmipenem'den daha etkili olduğu ve test edilen tüm bakteri suşları için biyofilm inhibisyonuna sağladığı bildirilmiştir (Al-Khafaji 2017).

Çalışmamızda oluşturulan 8 farklı Ag NP içerikli dezenfektan karışımının etkinlikleri *L. monocytogenes* biyofilmi üzerinde test edilmiştir. Bu test işleminde *L. monocytogenes* biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezenfektan karışımına maruz bırakılmıştır. *L. monocytogenes* biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 1. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 5,9 logaritmik azalma sağlamıştır. *L. monocytogenes* biyofilmi üzerinde test edilen dezenfektan

karışımları, 3. karışım dışında 5 logaritmik azalma sağlamışlardır. 3. dezenfektan karışımı biyofilmdeki canlı hücre sayısında 4 logaritmik azalma sağlamıştır.

Folsom ve Frank (2007) yaptıkları çalışmada *Listeria monocytogenes* Scott A'nın (SA) hipokloröz aside maruz kalmasının ardından, tanımlanan koloni varyantları hipokloröz aside toleranslı hale gelmiş ve artan miktarlarda biyofilm ürettikleri gözlemlenmiştir. Tüm kültürel varyantlar, süspansiyon içinde 120 ppm hipokloröz asitte hayatta kalabilmiştir. Kültürel varyantların, yaygın görülen *L. monocytogenes* bakterilerinden daha fazla miktarda biyofilm ürettiği tespit edilmiştir.

Chavant ve ark. (2004) çeşitli dezenfektan maddelerini (asetik asit, NaOH, %10 Na_2SO_4, %10 Na_2SO_4 ve asetik asit, %10 Na_2SO_4 ve NaOH, kuaterner amonyum ürünü (20 ppm) ve gliseril monolaurat (75 ppm)) ile biyofilm ve planktonik haldeki *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerinde uygulamışlardır. Alkali dezenfektanlar planktonik formlar ve 6 saatlik biyofilmler üzerinde başarılı olmuştur, fakat 7 günlük biyofilm üzerinde sadece kuaterner amonyum ürünü (20 ppm) %98'den daha fazla bakteri hücresi yok etmiştir, ancak 7 günlük biyofilmde bu dezenfektana direnç gelişmiştir.

Gram ve ark (2007) yaptıkları çalışmada, balık suyu sistemlerinde paslanmaz çelik yüzeylere bağlanan yaklaşık 10^4 CFU/cm^2 *L. monocytogenes* üzerinde aralarında alkali, klor ve hidrojen peroksit bazlı dezenfektanların da kullanıldığı dezenfektan karışımlarının tümü bakteriler yok etmiş ve bu sistemde tüm temizlik ve dezenfeksiyon ürünleri eşit derecede etkili olmuştur. Aynı deneyde çelik diskler bir balık veya et emülsiyonuna daldırıldığında, 20°C'de 2-3 gün sonra cm^2 başına 10^5–10^6 *L. monocytogenes*'e ulaşıldığında, alkali temizleme ürünleri (MC103 veya FC140) tarafından 2-3 logaritmik bakteri azalması kaydedilmiştir. Perasetik asit bazlı bir diğer dezenfektanın (Oxivit Active Plus) doğrudan kullanımı, somon emülsiyonlarına eklendiğinde tüm bakterileri öldürürken, et emülsiyon sisteminde yalnızca 1-2 logaritmik azalma görülmüştür ve temizlik ve dezenfeksiyon ürünlerinin *L. monocytogenes*'e karşı etkinliğinin, gıda matrisinden güçlü bir şekilde etkilendiği tespit edilmiştir.

Pan ve ark. (2006) daha önce peroksit bazlı ürünlerle muamele edilmiş *L. monocytogenes* biyofilmlerinde klora tolerans şeklinde çapraz bir direnç tanımlayarak, bu şekilde oksitleyici ajanların toleransından sorumlu mekanizmaların *L. monocytogenes'*de ortak bir yapıya sahip olabileceğini belirtmişlerdir. *L. monocytogenes* biyofilmlerinde, klor çözeltilerinin etkinliğinin büyük ölçüde biyofilm substratına bağlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin çelik yüzeylerde dezenfeksiyon işlemi polivinil klorid yüzeylerden daha başarılı olmuştur (Bremer ve ark 2002). Ayrıca gıda kalıntılarının mevcudiyeti, yüzeye yapışan bakterilerin dezenfeksiyona karşı direncini artırarak, sanitizasyon işlemlerini etkisiz hale getirip ve çapraz kontaminasyonu teşvik edebilmektedir (Aarnisalo ve ark. 2000; Gram ve ark. 2007).

L. monocytogenes ve *S. enterica* karışık kültür biyofilmleri bazı yaygın kimyasal antimikrobiyal bileşiklerin (benzalkonyum klorür (50 ppm), sodyum hipoklorit (10 ppm), perasetik asit (10 ppm), veya bir hidrojen peroksit-perasetik asit karışımı (herbiri 5 ppm)) uygulanmasıyla 15 °C de 6 dakika dezenfeksiyona tabi tutulmuştur. Bu antimikrobiyal bileşikle dezenfeksiyonunu takiben, öldürülen hücrelerin büyük çoğunluğu *S. enterica'*ya ait olduğu ve bunun bir sonucu olarak kalan canlı topluluk esas olarak *L. monocytogenes* hücrelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. *S. enterica* üzerinde benzalkonyum klorür dışında tüm dezenfektanlar; *Listeria monocytogenes* tekli biyofilminde ise 3 logaritmik üzerinde azalmayı sadece perasetik asit sağlamıştır (Kostaki ve ark. 2012).

Skowron ve ark (2018) aktif bileşikler olarak perasetik asit ve hidrojen peroksit, kuaterner amonyum bileşikleri, sodyum hidroksit veya sodyum hipoklorit içeren 4 dezenfektan *L. monocytogenes* suşlarının farklı yüzeylerde oluşturduğu biyofilmler üzerinde test edilmiştir. Bir dakikalık uygulama süresi sonunda perasetik asit ve hidrojen peroksit, çelik (6,63 log $CFU \times cm^{-2}$) ve kauçuk (5,10 log $CFU \times cm^{-2}$) yüzeyde canlı hücre sayısında en büyük azalmayı sağlamışlardır. Sodyum hidroksit (1,2 log $CFU \times cm^{-2}$) propilen yüzeyde, kuaterner amonyum bileşikleri ve sodyum hipoklorit (5,10 ve 3,84 log $CFU \times cm^{-2}$) alüminyum folyo yüzeyde canlı hücre

sayısında en büyük azalmayı sağlamışlardır. Başka bir çalışmada 500 ppm konsantrasyonda Ag NP'ler içeren polyester yüzeyde nemli büyüme koşullarında *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan biyofilmin etkili inhibisyonunu sağlanmıştır (Fontecha-Umaña ve ark. 2020).

Markowska ve ark. (2018) çalışmalarında Gram pozitif *L. monocytogenes*'in Ag NP'ler için MIC değerini 8 µg/ml olarak belirlemişlerdir ve Ag NP'lere duyarlılığının, MIC değeri 1 µg/ml'ye eşit olan Gram negatif patojenlerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145'da gözlemlenenden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Al-Shabib ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmada biyolojik yöntem ile üretilen Ag NP'lerin 8 µg ml^{-1} konsantrasyonundaki varlığında *L. monocytogenes* 19114 ve *L. innocua* 33090'da sırasıyla %62 ve %64 azalmış biyofilm oluşumu sağlanmıştır. 16 µg ml^{-1} konsantrasyonunda ise Ag NP'ler *L. monocytogenes* 13932'de biyofilm oluşumunu %57 oranında azaltmıştır. Ayrıca Ag NP'ler, düşük MIC'lerde (0,5 x MIC) *L. monocytogenes* 19114, *L. monocytogenes* 13932 ve *L. innocua* 33090'ın önceden oluşturulmuş biyofilmlerinde sırasıyla %48, %53 ve %58 azalma sağlamıştır.

Çalışmamızda son olarak *E. coli* O157 biyofilmi üzerine farklı boyutlardaki Ag NP içerikli dezenfektan karışımlarının etkinlikleri test edilmiştir. *E. coli* O157 biyofilmleri 1 dakika süre boyunca Ag NP içeren 8 farklı dezenfektan karışımına maruz bırakılmıştır. *E. coli* O157 biyofilmine en fazla etki eden ve biyofilm gelişimini engelleyen 1. dezenfektan karışımı, 1 dakika içinde 6,72 logaritmik azalma sağlamıştır. *E. coli O157* biyofilmi üzerinde test edilen dezenfektan karışımlarından, 1, 4, 6, 7, 8 numaralı karışımlar 6 logaritmik azalma sağlamışlardır. 2, 3 ve 5 numaralı dezenfektan karışımları biyofilmdeki canlı hücre sayısında 5 logaritmik azalma sağlamıştır.

Aryal ve Muriana (2019) yaptıkları çalışmada gıda ortamlarında güçlü biyofilmler oluşturan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* serovarlarının 7 günlük biyofilmi üzerinde antimikrobiyal etkinlik açısından beş farklı ticari

dezenfektanı (Kuaterner amonyum bileşikleri, hipoklorit, hidrojenperoksit, perasetikasit ve diasetin içerikli) incelemişlerdir. Kuaterner amonyum klorür ve klor bazlı dezenfektanlar en az etkiyi gösterdiği ve çeşitli biyofilmler üzerinde 2 saat içinde (1-2 log azalma) kısmi inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir. Her üç patojende de en iyi performans gösteren dezenfektan, 6-7 logaritmik azalma ile sonuçlanan modifiye QAC, hidrojen peroksit ve diasetin kombinasyonu olarak bildirilmiştir.

DeQueiroz ve Day (2007) çalışmalarında sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksitin bir kombinasyonunu oluşturarak 1, 5 ve 20 dakika uygulamada *P. aeruginosa* hücrelerini sırası ile 5-6 logartimik , 7 logaritmik azalma ve 20 dakikada tamamen canlı hücre kalmayacak etkili bir şekilde öldürerek paslanmaz çelik ve alüminyum yüzeylerde oluşan biyofilmlerin giderimini sağlamışlardır. Sodyum hipoklorit ile aynı konsantrasyon ve sürelerde; 1, 5 ve 20 dakika uygulamada *P. aeruginosa* hücrelerinde sırası ile 3-4 logartimik, 6 logaritmik ve 7 logaritmik azalma sağlamışlardır. Hidrojen peroksit uygulaması ise, *P. aeruginosa* hücrelerini ve biofilmi üzerinde bir azalma sağlamamıştır.

Wang ve ark (2020) birden fazla kimyasal reaktifi çeşitli fonksiyonel mekanizmalarla birleştiren (kuaterner amonyum bileşiği (QAC), hidrojen peroksit ve hızlandırıcı diasetin) içeren çok bileşenli bir dezenfektanı et işleme koşulları altında *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* biyofilmlerini etkisizleştirme ve gidermedeki etkinliği açısından test etmişlerdir. Ortak temas yüzeylerindeki *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* biyofilmleri, 10 dakika, 1 saat veya 6 saat boyunca %10, 20 veya %100 konsantrasyonlarda çok bileşenli dezenfektan çözeltisi ile muamele edilmiş ve biyofilm kütlesindeki logaritmik azalmaları ölçülmüştür. Karışım ile muamele sonrası canlı *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* biyofilm hücreleri tespit limitinin altında bulunmuştur, 10 dakika boyunca %20 çok bileşenli dezenfektanla muamele, biyofilm kütlesini önemli ölçüde azaltmış ve EPS bağlantısını zayıflatmıştır.

Mohammed (2019) çalışmasında tek başına kullanılan kalsiyum hipokloridin ($Ca(OCl)_2$) 2 mg/L konsantrasyonda, %50'lik bir öldürücü etkiye sahip olmasına karşın,

1,5 mg/L konsantrasyonda Ag NP'ler ile kompozit olarak kullanılan $Ca(OCl)_2$, 180 dakikalık maruziyetin ardından *E. coli, S. aureus* ve *Klebsiella pneumoniae* üzerinde tam öldürücü bir etkiye (%100) sahip olduğunu göstermiştir.

Salunke ver ark (2014) yaptıkları çalışmada Ag NP'lerin, *E. coli*'de %67, *S. aureus*'ta %78, *A. baumannii'*de %88 oranında biyofilm bozulmasını sağlamışlardır. Altın NP'ler ise Gram negatif bakterilerde yaklaşık %40 ve *S. aureus*'ta maksimum %95 biyofilm bozulmasına sebep olmuşlardır.

Chamakura ve ark. (2011) *E. coli* üzerinde süspansiyon testi kullanılarak Ag NP'lerin bakterisidal etkisini yaygın olarak kullanılan iki dezenfektan (sodyum hipoklorit (NaClO) ve fenol (C_6H_5OH) ile karşılaştırmıştır. Her iki dezenfektanın da *E. coli* üzerinde 10 dakika içinde hızlı bakterisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşılık, Ag NP'lerin 6 saat içinde yavaş ama uzun süreli bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir.

Ramachandran ve Sangeetha (2017), gümüş nanopartiküllerin *E. coli, K. pneumonia, P.* aeruginosa, *P. mirabilis* ve *A. baumanni'*ye karşı antibiyofilm aktivitesini değerlendirmişlerdir. 12,5-100 μg/mL konsantrasyon aralığında Ag NP'lerin test edilen bakterilerin biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde sınırlandırdığını belirtmişlerdir.

Alsammarraie ve ark (2018) yaptıkları çalışmada Ag NP'lerin, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı mükemmel bir antibakteriyel aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Ag NP'ler bakteriler ile 24 saat inkübasyondan sonra, kontrol gruplarına kıyasla bakteri hücre sayısında toplam 4 log CFU/mL azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Radzig ve ark. (2014) *E. coli* biyofilmlerine planktonik bakteriler için inhibitör bir konsantrasyonda 8,3 nm Ag NP'ler uygulandığında, NP'lerin bir etkisinin olmadığını

bildirmiştir; bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda (100-150 μg/ml) uygulandığında Ag NP'ler *E. coli* biyofilmindeki bakterilerin büyük çoğunluğunu öldürdüğünü göstermişlerdir.

Gıda endüstrisinde rutin olarak kullanılan dezenfektanlar gibi çevresel streslere karşı biyofilm içine gömülü bakteri hücrelerinin direnci önemli ölçüde arttırılabilmektedir (Williams ve Braun-Howland 2003). Bizim çalışmamızda tüm dezenfektan karışımları en yüksek etkinliği *E. coli* O157 biyofilmi üzerinde göstermişlerdir. *Salmonella* Enteridis ve *Listeria monocytogenes* biyofilmleri ile yapılan denemelerde maksimum 5 logaritmik azalma sağlanmasına karşın *E. coli* O157 üzerinde yapılan denemelerde 3 dezenfektan karışımı 5 logartimik, kalan 5 dezenfektan canlı hücre sayılarında 6 logartimikden fazla azalma sağlamıştır. Ayrıca çalışmamızda Ag NP'lerin en fazla azalmayı sağladığı bakteri biyofilmi de *E. coli* O157'dir.

Ag NP'lerin antimikrobiyal potansiyeli, mikroorganizmaların hücre duvarının kalınlığı ve bileşiminden de etkilenmektedir. *E. coli* gibi Gram negatif bakteriler, hücre zarındaki peptidoglikanın organizasyonundaki farklılık sebebi ile, Ag NP'lere *S. aureus* gibi Gram pozitif bakterilerden daha duyarlıdır. Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı negatif yüklü peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır ve peptidoglikan miktarı, Gram negatif bakterilerden nispeten daha fazladır ve daha uzun bir etkileşim gerektirmektedir (Rai ve ark. 2012).

Chamakura ve ark. (2011) Ag NP'lerin *E. coli* inaktivasyon mekanizmasının şu şekilde açıklamıştır; morfolojik ve elementel analizlerden elde edilen gözlemlere göre, ilk olarak, nanopartiküller, zardaki lipidlerin peroksidasyonu ve protein inaktivasyonu yoluyla *E. coli*'nin hücre duvarına ve plazma zarına ciddi hasar vermektedir. Bu etkilerin sonucunda duvar ve plazma zarının yapısal bütünlüğü bozulmakta, transport deregüle edilmekte ve K^+ sızıntısına yol açmaktadır. Ayrıca DNA'da gümüş etkileşimlerinden etkilenerek bakteri hücre fonksiyonunun devre dışı kalmasına daha fazla katkıda bulunabilmektedir. Ag NP'lerin bakterisidal ajan olarak benzersiz özelliği,

şu anda yaygın dezenfektanlar tarafından sunulmayan yeni uygulamalara yol açabilmektedir.

Antimikrobiyal mekanizması nispeten daha basit olan ve kısmi bakteriyel direncin ortaya çıkmasına sebep olan geleneksel antibiyotiklerin aksine, nanopartiküller mikroplarla aynı anda aktif olan çoklu mekanizmalar yoluyla savaşmaktadır. Birden fazla mutasyona sahip genleri bulunmadığı için mikroorganizmalar için NP'lere direnç geliştirmek çok daha zordur (Wang ve ark. 2017). Ayrıca *E coli*'yi düşük dozlarda inaktive etmek için Ag NP'leri kullanmanın bir diğer avantajı, ihmal edilebilir çevresel atık veya tehlikeli yan ürünler oluşturmasıdır (Chamakura ve ark. 2011).

Çalışmamızda test edilen dezenfektan karışımlarının bakteri suşları üzerindeki antibiyofilm etkisi SEM analizi ile saptanmıştır. Görüntüler etkinin iyi anlaşılabilmesi için farklı büyütme oranlarında *E. coli* O157 bakteri biyofilmi üzerinde dezenfektan uygulaması öncesi ve sonrası alınmıştır. SEM analizinde dezenfektan uygulaması öncesi şekil 4-19'da görülen tipik *E. coli* O157 biyofilm yapısı gözlenmektedir. Ag NP içeren dezenfektan eklenmeden oluşan *E. coli* biyofilmi hücre yüzeyleri ile beklenen normal hücresel morfolojiyi sergilemektedir. Yoğun şekilde yüzeye tutunmuş yer yer mantar yapısı oluşumu açıkça görülmektedir. Hücre yoğunluğu yüksek ve biyofilm kütlesi tüm yüzeyi sarmıştır. Biyofilm yüzey popülasyonu yoğun görünmektedir.

Bir çalışmada oluşturulan *E. coli* biyofilmi SEM analizinde yoğun yapılar arasında su kanallarına benzeyen düzensiz şekilli boşluklar ve bakteri hücreleri kümelenmiş bir biyofilm yapısı gözlenmiştir. Ag NP'ler olmadan büyütülen *E. coli* kültürleri, pürüzsüz hücre yüzeyli normal hücre morfolojiyi göstermiştir (Ansari ve ark. 2014).

Büyüme koşullarının aynı olduğu ancak Ag NP içeren dezenfektan varlığında; *E. coli* (Şekil 4-20) hücrelerinin morfolojilerinde değişiklikler olduğu ve Ag NP'lerin yüzeylerde bakteri kolonizasyonunu engellediği gözlemlenmiştir. Bakteri hücreleri

şişerek bölünmeyi durdurmuşlardır ve yüzeylerde yayılımları azalmıştır. Canlı bakteri hücrelerinin sayısı önemli ölçüde azalarak üç boyutlu görünüm bozulmuştur. Yüzeylerde biyokütle ve bakteri hücre yoğunluğu düşmüş, biyofilm yüzey popülasyonu azalmıştır.

Farklı Ag NP konsantrasyonlarının varlığında; *E. coli* hücreleri morfolojilerinde değişiklikler göstermiş ve Ag NP'lerin yüzeylerde bakteri kolonizasyonunu engellediği incelenmiştir. Hücre yüzeyinin pürüzlülüğünde artış gözlemlenmiştir (Ansari ve ark. 2014). Bir çalışmada 10 nm'den küçük Ag NP'ler, hücre duvarında gözenekler oluşturarak, bu gözenekler yardımı ile sitoplazmik ortama boşaltılarak hücre ölümünü, bakterilerin hücre içi ve hücre dışı proteinleri ve nükleik asitleri ile etkileşime girmeden yönetmektedir. Ag NP'lerin bazı hücrelerle etkileşimi, programlanmış hücre ölümü yani apoptoz sürecine neden olabilmektedir. SEM inceleme sonuçları Ag NP uygulması yapılan *E. coli* hücrelerinin hasar gördüğünü doğrulamış, bakterinin hücre duvarında "çukur" oluşumunu ve Ag NP'lerin bakteri zarında biriktiğini göstermiştir. Bu morfolojiye sahip zar, hücrenin ölümüyle sonuçlanan geçirgenlikte önemli bir artış sergilemiştir (Sondi ve Salopek-Sondi 2004).

Şekil 4-21 ve şekil 4-22'de Ag NP içeren dezenfektan karışımı uygulaması sonrası biyofilm içerisindeki *E. coli* O157 bakteri hücrelerinde oluşan hasar ve bölünmenin nasıl engellendiği gözlemlenmiştir. Kolonileşme sekteye uğramış ve biyofilm parçalanmıştır. Benzer şekilde daha önce yapılan bir çalışmada Ag NP uygulan *E. coli* bağlanmış yüzeyde uygulama sonrası SEM mikroskobu, nano boyutlu gümüş parçacıklardan ve ölü bakteri hücrelerinden oluşan makroskopik kümeleri göstermiştir (Sondi ve Salopek-Sondi 2004). Ag NP'lerin uygulama sonrası, muamele edilen yüzey morfolojisini, hücresel üst yapıyı, membran mikro ortamını, membran akışkanlığını, ergosterol içeriğini ve yağ asidi kompozisyonunu değiştirdiği gözlemlenmiştir (Radhakrishnan ve ark. 2018).

Ag NP içeren 1 numaralı dezenfekten karışımı uygulanmış yüzeyde gümüş nanopartiküllerin yüzey ve şekil morfolojisinin SEM'de kaydedilen görüntüsü şekil 4-

24’de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan nanopartiküller küresel yapıda ve 10 nm büyüklüğündedir. Gümüş nanopartikül yüzeylerinin pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda partikül boyutu azaldıkça gümüşün antibakteriyel aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Lee ve ark. 2003; Morones ve ark. 2005; Rai ve ark. 2009). Habash ve ark. (2013), küçük boyutlu (10 nm ve 20 nm) Ag NP'lerin biyofilm biyokütlesi ve biyofilm bakteriyel hücre canlılığının azalması açısından 100 nm partiküllerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, biyofilm yapısında veya hücresel morfolojide morfolojik bir değişiklik gözlenmediklerini belirtmişlerdir.

Ag NP'lerin antibakteriyel etkisi sadece doza bağımlı değildir, aynı zamanda şekle bağlıdır (Ali ve ark. 2020). Ali ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada hegzagonal şekilli Ag NP'lerin küresel şekilden daha önemli bir antibakteriyel etki gösterdiğini bildrimiştir. Diğer bir çalışmada bazal düzlem olarak bir kafes düzlemi olan kesik üçgen Ag NP'lerin, küresel partiküllere göre *E. coli'*nin büyümesi üzerinde daha etkili olduğu, kesik üçgen şekilli Ag NP’lerin bakteri inhibisyonu 1 mg/L'de gerçekleşirken, küresel şekilli Ag NP’lerde bakteri inhibisyonu 12,5 mg/L konsantrasyonda gerçekleşmiştir (Pal ve ark. 2007).

Bakteri hücre zarları, kükürt oluşturan proteinler ve kükürtlü amino asitler içermektedir; hem hücre zarının içi hem de dışında gümüş, bu kükürlü bileşenler ile etkileşime girerek bakteriyel inaktivasyona oluşturmaktadır. Ayrıca, Ag NP'lerden salınan gümüş iyonu, DNA'daki fosforla ve ayrıca kükürt içeren proteinlerle etkileşime girerek enzim aktivitelerinin inhibisyonu sağlamaktadır. Partikül boyutu ve şekli de antimikrobiyal aktiviteyi belirleyen diğer parametrelerdir. Boyuta bağlı çalışmada, NP'lerin boyutu 20 nm’den küçük ise, membranın kükürt içeren proteininin daha fazla bağlanmasını sağlayarak membranda maksimum geçirgenliğe ve akabinde bakterilerin hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (Morones ve ark. 2005).

Restoran mutfaklarındaki yüzeylerden alınan ve dezenfektan etkinliği gösteren yüzey swabı numunelerinin canlılık oranı sonuçları tablo 4-2'de gösterilmiştir. Çalışmanın yapıldığı dönem, Covid 19 pandemi kapanma dönemi olan 2021 Şubat ayı, sıcaklık değerlerinin düşük olduğu bir dönemde ve restoranlar sadece paket servis olarak hizmet vermektedir. Bu çalışmada yüzeylerde maksimum 10^3 seviyelerinde üreme gözlemlenmiştir ve 2. ve 4. dezenfektan karışımlarının 1 logaritmik azalma sağladığı tespit edilmiştir. Daha yüksek üreme olan yüzeylerde çalışma yapılamadığı için dezenfektanların tam etkinliği belirlenememiştir. Literatürde benzer nanopartikül ile yapılmış bir çalışma bulunamamıştır. Ancak kullanılan dezenfektanların gıdalarda ve yüzeylerinde kullanımı ile ilgili bu bölümde bahsedilen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Temizlikte amaç EPS tabakasını parçalamaktadır. Biyofilmin uzaklaştırılmasında klor, iyot ve dörtlü amonyum bileşikleri etkili sonuç vermemiştir. Peroksit ve peroksit içeren dezenfektan maddeleri biyofilm gideriminde daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Peroksitlerin korozif olmaması da avantajları arasındadır (Brooks ve Flint 2008). $Ca(OCl)_2$/Ag NP ile emprenye edilmiş filtre kağıdı, mevcut patojenik bakterilere, bakteri toplam canlı sayısına, toplam koliform sayısına ve dışkı koliform sayısına karşı biyosidal bir etki (%100) sergilemiştir (Mohammed 2019). Ag NP'lerin biyosidal aktivitesi, çok çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalara, maya, fungi ve virüslere karşı rapor edilmiştir (Hamouda 2012).

Mohanta ve ark. (2017) biyosentezle üretilen Ag NP'lerin Gram negatif ve Gram pozitif örnekler olarak gıda kaynaklı patojenlere, yani *S. aureus, E. coli, Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitelerini tanımlamış ve bu tür nanopartiküllerin gıda ambalaj malzemelerinin yanı sıra dezenfektan ve temizlik maddelerinde uygulanmasını önermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda %3'lük hidrojen peroksitin bakteriler üzerinde hızlı, mayalar, bazı virüsler ile bakteri sporları üzerinde ise daha yavaş bir şekilde inaktivasyona yol açtığını göstermiştir. Genellikle Gram negatif bakteriler, Gram pozitif

bakterilere göre hidrojen perokside daha hassastırlar. Sıcaklık ve konsantrasyondaki artış spor sayısının azaltılmasında başarılı sonuçlar vermiştir (Block ve Febiger 1991).

Yapılan bir araştırmada marul örneklerinde başlangıçta saptanan *Enterobacteriaceae* yükünde 50 ppm klor ile 5 dakika dezenfeksiyon sonucunda 5,31 log CFU/g, 15 dakika dezenfeksiyon sonucunda ise 5,48 log CFU/g azalma belirlenmiştir. Klorun dezenfeksiyonda kullanılan miktarı 200 ppm'e çıkarıldığında ise 5 ve 15 dakikalık uygulama sonucunda 5,69 log CFU/g azalma görülmüştür (Ayhan ve Bilici 2017). Klor bakterilerin hücre zarındaki proteinlerini bağlamak suretiyle organizmayı tahrip eden N-kloro bileşiklerini oluşturarak, hücre içi bileşiklerinin hücre membranından dışarıya difüzyonunu sağlayarak ve hücre zarını tahrip ederek inaktivasyonu sağlamaktadır. Başka bir şekilde klor, bakterilerin sahip oldukları enzimlerin SH gruplarını yükseltgeyerek oksidatif etki göstermekte ve gerçekleşen reaksiyon tersinir olmadığı için mikroorganizmayı tahribata uğramaktadır (Block ve Febiger 1991).

Yapılan bir çalışmada bir kafetarya mutfağında 70 farklı gıda patojeni bakteri türü izole edilmiştir. En sık izole edilen cinsler *Bacillus* (%33), *Acinetobacter* (%17), *Kocuria* (%12) ve *Staphylococcus* (%5) olarak belirlenmiştir. *Bacillus* cinsi, biyofilm oluşumunun en güçlü kapasitesini göstermiştir (Lim ve ark. 2017).

Gıda kaynaklı bakteriler, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, benzalkonyum klorür, laktik asit ve sitrik asit gibi dezenfektanlara farklı duyarlılık seviyeleri göstermiştir. Bununla birlikte, biyofilm oluşumundan sonra duyarlılıklar suşa bağlı olarak değişmiş ve izolatlar arasında direnç seviyeleri değişmiştir (Lim ve ark. 2017). Bu tür antimikrobiyal ajanların biyofilmler oluştuğunda etkinliğinin azalmasının sebebi, bu tür reaktif biyositlerin biyofilmin içine yeterli miktarda penetrasyon sağlayamamasıdır (Huang ve ark. 1995). Ag NP'lerin antibiyotiklerle sinerjik antibakteriyel aktivitesi, karışım çözeltisinin bakteri hücre zarına kolayca nüfuz etmesi, hücrelerde ciddi hasara ve bakterilerin ölümüne neden olabilir. Bu etki çoklu ilaca

dirençli patojenik bakterilerin öldürülmesini sağlayabilmektedir (Kukushkina ve ark. 2021).

Patojen bakterilerin gıda işletmelerinde oluşturduğu biyofilmler önemli bir risk oluşturan ve halk sağlığı açısından büyük etkileri olan ve önlem alınması gereken bir konudur. Antimikrobiyal olarak farklı tipte dezenfektanlarla gümüş nanopartiküllerin (Ag NP'ler) kombine kullanımı, dezenfektanların biyosidal etkisinin güçlü bir şekilde arttırılmasıyla bakteriyel direnç geliştirme sorununun hafifletilmesinde faydalı olabilir. Çalışmamız sonucunda oluşturduğumuz tüm dezenfektan karışımları test ettiğimiz Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde anlamlı bir azalma sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H. ve Sjöberg, A. M. (2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, ***20***, 237-250.

Abed, A. (2017). Synthesis and study silver nanoparticles by chemical method. *Diyala Journal for Pure Science*, ***13*****(1)**, 127-138.

Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P. ve Van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, ***22*****(2)**, 172-179.

Abu-Lail, N. ve Beyenal, H. (2013). Characterization of bacteria-biomaterial interactions from a single cell to microbial communities. İçinde Bose, S. ve Bandyopadhyay, A. (Ed.), *Characterization of Biomaterials,* Elsevier; 235-253.

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. ve Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, ***196*****(7)**, 453-472. DOI: 10.1007/s00203-014-0983-1

AbdelRahim, K., Mahmoud, S. Y., Ali, A. M., Almaary, K. S., Mustafa, A. E. Z. M. ve Husseiny, S. M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, ***24*****(1**), 208-216.

Afreenish, H., Javaid, U., Fatima, K., Maria, O., Ali, K. ve Muhammad, I. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases,* ***15*****(4**), 305–311.

Al-Bataineh, S. A., Britcher, L. G., ve Griesser, H. J. (2006). XPS characterization of the surface immobilization of antibacterial furanones. *Surface Science*, ***600*****(4**), 952-962.

Alfadul, S. M. Ve Elneshwy, A. A. (2010). Use of nanotechnology in food processing, packaging and safety–review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, ***10*****(6),** 2720-2739.

Algburi, A., Zehm, S., Netrebov, V., Bren, A. B., Chistyakov, V. ve Chikindas, M. L. (2017). Subtilosin Prevents Biofilm Formation by Inhibiting Bacterial Quorum Sensing. *Probiotics and Antimicrobial Proteins,* ***9*****(1),** 81-90.

Ali, H.R., Emam, A.N., Koraney, N.F. ve ark (2020). Combating the prevalence of water-borne bacterial pathogens using anisotropic structures of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, ***22***, 47.

Al-Khafaji, M. H. (2017). The ınhibition activity of silver nanoparticles compared with D-glycin and Imipenem effect on the biofilm formation by food-origin *Salmonella* isolates. *Iraqi Journal of Science*, ***58***, 836-842.

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg ve ark. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, ***59*****(4),** 1114-1128.

Alsammarraie F. K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A. ve Lin, M. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces****, 171****,* 398-405.

Alsayeqh, A. F. (2010). Possible factors for food safety infraction and fraud continuity in restaurants in Saudi Arabia. *Assiut Veterinary Medical Journal,* ***61(146***), 154-169.

Al-Shabib, N.A., Husain, F.M., Hassan, I., Khan, M.S., Ahmed, F., Qais, F.A. ve ark. (2018). Biofabrication of zinc oxide nanoparticle from ochradenus baccatus leaves: Broad-spectrum antibiofilm activity, protein binding studies, and in vivo toxicity and Stress studies. *Journal of Nanomater,* ***2018***, 8612158.

Altun, H.U. ve Şener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi,* ***39***, 82-88.

Ames, P., Folsom, J. ve Frank, F. (2007). Proteomic analysis of a hypochlorous acid–tolerant Listeria monocytogenes cultural variant exhibiting enhanced biofilm production. *Journal of Food Protection*, ***70*****(5),** 1129–1136.

An, Y. H., ve Friedman, R. J. (Ed.). (2000). *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications* (Vol. 204). Springer Science & Business Media: Berlin, Germany.

Andersson, S. (2009). *Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment*. Doctoral dissertation, Kungliga Tekniska Högskolan.

Anonim, (1997). European Standard EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics – basic bacteriocidal activity – test method and requirements (phase 1).

Anonim (2001). European Standard EN 13697: Chemical disinfectants and antiseptics – qualitative non-porous surface test for the evaluation of bacteriocidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2).

Ansari, M.A., Khan, H. M., Khan, A.A., Cameotra, S.S. ve Alzohairy, M. A. (2015). Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, ***33*(1)**,101-9.

Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A ve arkadaşları (2014). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum β-lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Nanoscience*, **4**, 859–868.

Arampatzi, S. I., Giannoglou, G. ve Diza, E. (2011). Biofilm formation: A complicated microbiological process. *Aristotle University Medical Journal*, ***38*(2)**, 21-29.

Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid J.G., Powers, M.E ve Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, ***2*(5)**, 445-459,

Aryal, M. ve Muriana, P. M. (2019). Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes, E. Coli* O157:H7 and *Salmonella* biofilms. *Foods*, ***8*(12)**, 639.

AshaRani, P. V., Low Kah Mun G, Hande, M.P. ve Valiyaveettil S. (2009). *Cytotoxicity and* genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, ***3*(2),** 279-290.

Ashgar, S.S., Oldfield, N.J., Wooldridge, K.G., Jones, M.A., Irving, G.J., Turner, D.P. ve Ala'Aldeen, D.A. (2007). CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal of Bacteriology*, ***189,*** 1856–1865.

Augustin, M., Ali-Vehmas, T. ve Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, ***7,*** 55-64.

Ayhan, B. ve Bilici, S. (2017). Toplu beslenme sistemlerinde kullanılan farklı dezenfektanların çiğ servis edilen marulun mikrobiyal yüküne etkisi. *Beslenme ve Diyetetik Dergisi,* **45(2),** 145-152

Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R. ve ark. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology, **43*****(3),** 313-351.

Back, K. H., Ha, J. W. ve Kang, D. H. (2014). Effect of hydrogen peroxide vapor treatment for inactivating *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Food Control*, **44**, 78-85.

Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. ve Gram, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.*, ***67*****(5),** 2319-2325.

Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J., & Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology, **5*****(2),** 244-249.

Baltzer, S. A. ve Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides–promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, **20*****(4),** 228-235.

Banerjee, I., Pangule, R. C. ve Kane, R. S. (2011). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials, **23***, 690–718.

Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., De, S. P. ve Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **339*****(1-3)**, 134-139.

Barnhart, M. M. ve Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology, **60,*** 131-147.

Baş, M., Yüksel, M. ve Çavuşoğlu, T. (2007). Difficulties and barriers for the implementing of HACCP and food safety systems in food businesses in Turkey. *Food Control*, ***18*****(2)**, 124-130.

Bauer, W., Mathesius, U. ve Teplitski, M. (2005). Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing. *The American Society for Microbiology News*, ***71*****(3)**,129-135.

Bai, J. A. ve Vittal, R. R. (2014). Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their in vivo efficacy in food systems. *Food Biotechnology, **28*(3),** 269-292.

Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J. ve ark. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology, **186*(14),** 4665-4684.

Belessi, C. E., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N. ve Skandamis, P. N. (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, ***1(145),*** 46-52.

Beloin, C., Roux, A. ve Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, ***322***, 249–289.

Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G. ve Brun, Y. V. (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiology Spectrum*, ***3*(4),** 163-199.

Bjarnsholt, T. ve Givskov, M. (2008). Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort?. *Current Infectious Disease Reports*, ***10*(1**), 22.

Block, S. S. ve Febiger, L. (1991). *Disinfection, sterilization, and preservation.* 4th ed. Philadelphia (Pa.): Lea and Febiger.

Bogino, P. C., Oliva, M. L, Sorroche, F. G. ve Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sci*ences, ***14*(8**), 15838-59

Boles, B. R., Thoendel, M. ve Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, ***57*(5),** 1210-1223.

Boretska, M., Bellenberg, S., Moshynets, O., Pokholenko, I. ve Sand, W. (2013). Change of extracellular polymeric substances composition of *Thiobacillus thioparus* in presence of sulfur and steel. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, ***5***, 68-73.

Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, ***75*(4)**, 827-842.

Boulané-Petermann, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling*, ***10*(4)**, 275-300.

Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T. R., Wecke, J., Lawrence, J. R. ve Szewzyk, U. (2006). Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, ***262*(1)**, 31-38.

Branda, S. S., Vik. S., Friedman, L. ve Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, **13(1)**, 20-26.

Bremer P.J., Monk I. ve Butler R. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* /*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: Impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters of Applied Microbiology*, ***35***, 321–325.

Brooks, J. D. ve Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, ***43*(12),** 2163-2176.

Brown, M. R., Allison, D. G. ve Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ***22***, 777–780.

Bryan, F. L. (1990). Hazard analysis critical control point (HACCP) systems for retail food and restaurant operations. *Journal of Food Protection*, ***53*(11)**, 978-983.

Bryers, J.D. (2008), Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, ***100***, 1-18.

Budi Harmami, S., Sondari, D. ve Haryono, A. (2008). The synthesis of silver nanoparticles, produced by chemical reduction of silver salt solution. Indonesian Journal of Materials, ***43*(1),** 233-236.

Bullitt, E. ve Makowski, L. (1995). Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature*, ***373*(6510),** 164-167.

Caldwell, D. E., Atuku, E., Wilkie, D. C., Wivcharuk, K. P., Karthikeyan, S., Korber, D. R. Ve ark. (1997). Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Advances in Dental Research*, ***11*(1),** 4-13.

Camargo, A.C., Woodward, J.J., Call, D.R. ve Nero, L.A. (2017). *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease* ***14***, 623-636.

Cap, M., Vaudagna, S., Mozgovoj, M., Soteras, T., Sucari, A., Signorini, M. and Leotta, G. (2019). Inactivation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef by electrolytically-generated hypochlorous acid, peroxyacetic acid, lactic acid and caprylic acid. *Meat Science*, ***157***, 107886.

Cappitelli, F., Polo, A. ve Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews Journal*, ***6*** **(1–2)**, 29–42.

Carbone, M., Donia, D. T., Sabbatella, G. ve Antiochia, R. (2016). Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University-Science*, ***28*****(4**), 273-279.

Carpentier, B. ve Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, ***75*****(6)**, 499-511.

Cavaliere, R., Ball, J. L., Turnbull, L. ve Whitchurch, C. B. (2014). The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen*, ***3*****(4),** 557-567.

Chandy, J. P. ve Angles, M. L. (2001). Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. Water Research, ***35*****(11**), 2677-82.

Chamakura, K., Perez-Ballestero, R., Luo, Z., Bashir, S. ve Liu, J., (2011). Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, ***84(*****1),** 88-96.

Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T. ve Desvaux, M. (2013). Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology*, ***4,*** 303.

Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, ***51*****(2)**, 133-138.

Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*, ***51*****(4)**, 271-276.

Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M. ve Archambault, M. (2017). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiology*, ***62***, 32-38.

Chavant, P. Gaillard-Martinie, B. ve Hébraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase, *FEMS Microbiology Letters*, ***236*****(2),** 241–248

Chernousova, S. & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, ***52*****(6)**, 1636-1653.

Chırkena, K., Ulusoy, B. ve Hecer, C. (2019). Bacterial biofilms: formation, properties and prevention in food industry. Aydın Gastronomy, ***3*****(2)**, 87-100.

Chmielewski, R. A. N. ve Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ***2*****(1)**, 22-32.

Choi, O. Yu, C. P., Fernández, G.E. ve Hu, Z. (2010). Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Research*, ***44***, 6095-6103.

Chouhan, N. (2018). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. İçinde: *Silver Nanoparticles—Fabrication, Characterization and Applications*. London: IntechOpen; 21–56.

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

Christensen, B. E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, ***10*****(3-4)**, 181-202.

Cloete, T.E. ve Jacobs, L. (2001). Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA*, ***27***, 21-26.

Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration ve Biodegradation*, ***51*****(4)**, 277-282.

Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S. ve Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*, ***6*****(3)**, 41.

Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K.A., Walsh, C., Burgess, C., ve ark. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, ***78*** **(9)**, 3087-3097.

Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M. M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L. ve Block, J. C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, ***38*****(10)**, 1093-1105.

Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P. ve Cormican, M. (2014). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied Environmental Microbiol*ogy, ***80*****(4**), 1507-1514.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. ve Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, ***41*****(1)**, 435-464.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. ve Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, ***49*****(1)**, 711-745.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. ve Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, ***284*****(5418)**, 1318-1322.

Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C. ve Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, ***7***, 1641.

Cruz, C. D., ve Fletcher, G. C. (2012). Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes. Food Control*, ***26*****(1),** 194-199.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í. ve Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, ***183*****(9)**, 2888-2896.

Çiftçi, Z. (2005). Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.

Da Silva, E. P. ve De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, ***97*(3)**, 957-968.

Dağ, A. (2014). Nanoteknolojinin gıdalara uygulanması ve sağlık üzerine etkisi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, ***42*(2)**, 168-174.

Daniels, M. A., Teixeiro, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G. A., Gascoigne, N. R. ve Palmer. E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature*. **444(7120),** 724-729.

Darouiche, R. O., Mansouri, M. D., Gawande, P. V. ve Madhyastha, S. (2009). Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB® combination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ***64*(1)**, 88-93.

Das, R., Gang, S. ve Nath, S. S. (2011). Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, ***2*(4),** 472.

Davey, M. E. ve O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, ***64*(4)**, 847-867.

Davey, M. E., Caiazza, N. C. ve O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, ***185*(3)**, 1027-1036.

Deibel, V. ve Schoeni, J. (2002). Biofilms: forming a defense strategy for the food plant. *Food Safety Magazine*, ***8,*** 49-50.

DeQueiroz, G. ve Day, D. (2007). Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 794-802.

Dhayakaran, R. ve Neethirajan, S. (2017). Microscopic methods in biofilm research. İçinde *Murthy, S.(Ed.), Biofilms: Emerging Concepts and Trends. İndia, Narosa Publishers*; 24

Djordjevic, D., Wiedmann, M. ve McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, ***68*(6)**, 2950-2958.

Dogan, B. ve Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp*. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, ***69*(1)**, 130-138.

Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Journal of Infection*, ***46*(4)**, 207-214.

Dong, Y. H. ve Zhang, L. H.(2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, ***43*,**101-109.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases Journal, ***8*(9**), 881-90.

Donlan, R. M. ve Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, ***15*(2),** 167-193.

Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, ***11*(1)**, 30-36.

Dudeja, P. ve Singh, A. (2017). Food safety in large organized eating establishments. İçinde Gupta, R.K., Dudeja, P. ve Singh, M. (Ed.), *Food Safety in the 21st Century*. London: Academic Press; 339-353.

Dukan, S. A. M. ve Touati, D. (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, ***178*(21),** 6145-6150.

Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, ***363*(1)**, 1-24.

Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J. ve Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, ***12*(3),** 789–799.

El-Kheshen, A. A. ve Gad El-Rab. S.F.(2012). Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity, *Der Pharma Chemica*, ***4***, 53-65.

Ergin, M. A. (2017). Bacterial biofilm detection methods in the laboratory. İçinde: *Mandez-vilas (Ed)., Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs. Spain, Formatex;* 289-293.

Fedotova, A.V., Snezhko, A.G., Sdobnikova, O.A., Samoilova, L.G., Smurova, T.A., Revina, A.A. Khailova, E.B. (2009). Packaging materials manufactured from natural polymers modified with silver nanoparticles. *Plastičeskie Massy: Naučno-Techničeskij Žurnal*, ***7***, 42–47.

Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. ve Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, ***52*****(4)**, 662-668.

Filik, F. ve Kubilay, A. (2019). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı in vitro metodlarla tespiti. *Acta Aquatica Turcica*, ***15*****(3),** 378-390.

Filippo, E., Serra, A., Buccolieri, A. ve Manno, D. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: morphological and structural characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, ***356*****(6-8**), 344-350.

Finore, I., Di Donato P., Mastascusa V., Nicolaus B. ve Poli A. (2014). Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Marine Drugs*,***12***, 3005–3024.

Flemming, H.C. ve Schaule, G. (1996). Biofouling. İçinde: Heitz, E., Flemming, H.C. ve Sand, W. (ed) *Microbially Influenced Corrosion of Materials*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 39–54.

Flemming, H. C., Neu, T. R. ve Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*,***189*****(22)**, 7945-7947.

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

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. ve Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, ***14,*** 563–575.

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

Flint, S. H., van den Elzen, H., Brooks, J. D. ve Bremer, P. J. (1999). Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. *International Dairy Journal*, ***9*(7),** 429-436.

Folsom, J. P. ve Frank, J. F. (2007). Proteomic analysis of a hypochlorous acid-tolerant *Listeria monocytogenes* cultural variant exhibiting enhanced biofilm production. *Journal of Food Protection*, ***70*(5),** 1129–1136.

Fong, J. ve Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiology Spectrum*, ***3*(2),** 10.1128.

Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., Ripolles-Avila, C. ve Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). Antimicrobial Activity and Prevention of Bacterial Biofilm Formation of Silver and Zinc Oxide Nanoparticle-Containing Polyester Surfaces at Various Concentrations for Use. *Foods*, ***9*(4),** 442.

Forsythe, S. J. ve Hayes, P. R. (1998). Food Hygiene, Microbiology and HACCP. (3rd ed.) Gaithersburg, ABD, Aspen Publishers Inc; 87-145.

Forsythe S. J. (2000). The Microbiology of Safe Food. Oxford, Blackwell Science.

Frank J. F. (2000). Control of biofilm in the food and beverage industry. İçinde: Walker J, Surman S ve Jass J, (Ed*), Industrial Biofouling*. Chicester, N.Y.: John Wiley & Sons Ltd.; 205-224.

Franklin, M. J., Chang, C., Akiyama, T. ve Bothner, B. (2015). New technologies for studying biofilms. *Microbiology Spectrum*, ***3* (4),** 1-25.

Fratamico, P. M., Annous, B. A. ve Guenther, N. W. (Eds.). (2009). *Biofilms in the food and beverage industries*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Ltd.

Frattini, A., Pellegri, N., Nicastro, D. ve de Sanctis, O. (2005). Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Materials Chemistry and Physics*, ***94*,** 148–152.

Fraud, S., Maillard, J. Y., Denyer, S. P., Kaminski, M. A. ve Hanlon, G. W. (2007). A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of *Streptococcus mutans* biofilms. *European Journal of Oral Sciences*, ***115*(1)**, 71-76.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R. ve Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, ***42*(8**), 872-874.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. ve Nielsen, P.H., (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Reserch, ***30*** **(8**), 1749–1758.

Furukawa, S., Yoshida, K., Ogihara, H., Yamasaki, M. ve Morinaga, Y. (2010). Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, ***74*****(11)**, 2316-2319.

Fux, C. A., Wilson, S. & Stoodley, P. (2004). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphyloccocus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *Journal of Bacteriology*, ***186*****(14)**, 4486-4491.

Gaidhani, S., Singh, R., Singh, D., Patel, U., Shevade, K., Yeshvekar, R.ve Chopade, B. A. (2005). Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *Materials Letters*, ***108***, 324-327.

Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J. ve Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, ***9***, 898.

Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch M. ve Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. Chemical Reviews, ***111,*** 28–67.

Garrett, T. R., Bhakoo, M. ve Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, ***18*****(9)**, 1049-1056.

Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O. ve Götz, F. (1998). Characterization of theN-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *Journal of Biological Chemistry*, ***273*****(29),** 18586-18593.

Gião, M. S. ve Keevil, C. W. (2014). *Listeria monocytogenes* can form biofilms in tap water and enter into the viable but non-cultivable state. *Microbial ecology*, ***67*****(3)**, 603-611.

Gilbert, P. ve McBain, A. J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **16(2)**, 189-208.

Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L. M. ve ark. (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **110*(**28**), 11541-1156.

González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G. ve Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **17*(**5),** 1261-1276.

Goodwin, J. A. S. ve Forster, C. F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Research, **19*(**4),** 527–33.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. ve Givskov, M.(2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, ***78*(1-2**), 79-97.

Gram, L., Bagge-Ravn, D., Yoke, Y. N., Gymoese, P. ve Fonnesbech Vogel, B. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface *attached Listeria monocytogenes. Food Control*, ***18*(10),** 1165-1171.

Grasso, D., Smets, B. F., Strevett, K. A., Machinist, B. D., Van Oss, C. J., Giese, R. F. ve Wu, W. (1996). Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology, **30*(**12),** 3604-3608.

Green, P. N. (1993). Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms. *Letters in Applied Microbiology, **17*(**4**), 158-161.

Gurunathan, S., Han, J. W., Kim, E., Kwon, D. N., Park, J. K. ve Kim, J. H. (2014). Enhanced green fluorescent protein-mediated synthesis of biocompatible graphene. *Journal of Nanobiotechnology, **12*(**1),** 41.

Güvense, N.C. ve Ekmekcioğlu, S. (2016). Biyofilm kontrolünde biyositler ve etki tarzları. *Mikrobiyoloji Dergisi, **14***, 1-19.

Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. ve Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Science and Technology, **37*(**4**), 453-460.

Habash, M. B., Park, A. J., Vis, E. C., Harris, R. J. ve Khursigara, C. M. (2014). Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **58,*** 5818–5830.

Hakim H., Alam M. S., Sangsriratanakul N., Nakajima K., Kitazawa M., Ota M. ve ark. (2016). Inactivation of bacteria on surfaces by sprayed slightly acidic hypochlorous acid water: in vitro experiments. *Journal of Veterinary Medical Science, **78***, 1123–1128.

Hamouda I. M. (2012). Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research*. ***26(3)***, 143-51.

Hamilton, H. L., Dominguez, N. M., Schwartz, K. J., Hackett, K. T. ve Dillard, J. P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology Journal*, ***55***, 1704–1721.

Hall stoodley L. ve Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology, **13***, 7-10.

Hammer, B. K. ve Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, ***50***,101–114.

Hançer Aydemir, D. (2018). Bakteriyal Biyofilmlerin Biyolojik Önemi ve Etkili Kontrol Stratejileri . *Turkish Journal of Life Sciences* , ***3*** **(1)** , 218-230 .

Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences, **4,*** 9-12.

Hati, S. Mandal, S., Minz, P., Vij, S., Khetra, Y., Singh, B. ve Yadav, D. (2012). Electrolyzed oxidized water (eow): non-thermal approach for decontamination of food borne microorganisms in food ındustry. *Food and Nutrition Sciences*, ***3*****(6),** 760-768.

Havelaar, A. H. (1994). Application of HACCP to drinking water supply. *Food Control*, ***5*****(3)**, 145-152.

Hegarty, R., Goopy, J., Herd R. ve McCorkell, B. (2007). Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science*. ***85*****(6),**1479–1486.

Hepdeniz, Ö. K. ve Seçkin, Ö. (2017). Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm. *SDÜ Saglik Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, ***8*****(3),** 47-55**.**

Hibiya, K., Nagai, J. ve Tsuneda, S. (2003). Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, ***19*** **(1)**, 61 – 68.

Holah, J.T. (1995). Special needs for disinfectants in food handling establishments. *Disinfectants: Actions and Applications*, ***14*** **(1),** 95–104.

Holah J.T. ve Gibson H. (1999): Biofouling: Cleanability problems in food processing? İçinde: Wirtanen G., SaloS., Mikkola A. (eds): Proceedings of 30th R3 – Nordic Contamination Control Symposium, VTT Symposium 193, Espoo: 177–186.

Holmberg, T. ve Wallin, H. (2010). Handbok i HACCP för små och stora företag. United Kingdom, Highfield Publications; 24-34.

Huang, R., Li, M. ve Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, ***2*****(5),** 435-444.

Huang, C.T., Yu, F.P., McFeters, G.A. ve Stewart, P.S. (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology,* ***61***, 2252–2256.

Hui, Y. H. (2002). The FDA's GMPs, HACCP, and the Food Code. İçinde. Hui, Y.H., Bruinsma, L. B., Gorham, J. R., Wai-Kit, N., Tong, P. S. ve Ventresca, P. (Ed.), *Food Plant Sanitation*. New York: Marcel Dekker; 55-75.

Hung, R.J., Spaeth, C.S., Yesilyurt, H.G. ve Terman, J.R. (2013). SelR reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics. *Nature Cell Biology,* ***15(*****12**), 1445--1454.

Ibáñez de Aldecoa, A. L., Zafra, O. ve González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Frontiers in Microbiology,* ***8,*** 1390.

Jaiswal, L., Shankar, S. ve Rhim, J. W. (2019). Applications of nanotechnology in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods,* ***46***, 43-60.

Jahid, I. K. ve Ha, S. D. (2014). The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ***13*****(5**), 990-1011.

Javaherdashti, R. (2008). Microbiologically influenced corrosion (MIC). *Microbiologically Influenced Corrosion: An Engineering Insight*, 29-71.

Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters*, ***236*****(2),** 163-173.

Jeong, D. K. ve Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *LWT-Food Science and Technology*, ***27*****(5)**, 415-424.

Jones, T.F. ve Angulo, F.J. (2006). Eating in restaurants: A risk factor for foodborne disease? *Clinical Infectious Diseases,* **43**, 1324-1328.

Jones, E. A., McGillivary, G. ve Bakaletz, L. O. (2013). Extracellular DNA within a nontypeable haemophilus influenzae-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *Journal of Innate Immun*, ***5***, 24–38.

Joseph, B., Otta, S. ve Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, ***64***, 367–372.

Jurcisek, J. A. ve Bakaletz, L. O. (2007). Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *Journal of Bacteriology*, ***189*****(10)**, 3868-3875.

Kaplan, J. Á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, ***89*****(3)**, 205-218.

Kaplan H. B, Greenberg E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. Journal of Bacteriology, ***163*****(3),** 1210-1214.

Karatan, E. ve Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, ***73*****(2),** 310-347.

Keskinen, L. A. ve Annous, B. A. (2011). Efficacy of adding detergents to sanitizer solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on Romaine lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, ***147*****(3),** 157-161.

Kırmusaoglu S. (2016). Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm embedded microorganisms. İçinde: Dhanasekaran D. ve Thajuddin N. (Ed.). *Microbial Biofilms—Importance and Applications*. Croatia: InTech; 189-209.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J. ve ark. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, ***3*****(1**), 95-101.

Kim S., An S., Park B., Oh E. G., Song K. C., Kim J. W., ve ark. (2016). Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the oyster *Crassostrea gigas*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, ***49***, 116–123.

Kinsinger, R. F., Shirk, M. C. ve Fall, R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*, ***185*****(18),** 5627-5631.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. ve Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, ***48*****(6),** 1511-1524.

Klemm, P., Vejborg, R. M. ve Sherlock, O. (2006). Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *International Journal of Medical Microbiology*, ***296*****(4-5),** 187-195.

Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S. ve ark. (2007). Active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA, ***298*****(15),** 1763-1771.

Knetsch, M. L. ve Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. Polymers, ***3*****(1),** 340-366.

Koluman, A., (2006). Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi, http://vetgida.veterinary.ankara.edu.tr/bilimsel/biyofilm.pdf. Erişim Tarihi:16.08.2020.

Kostaki M., Chorianopoulos N., Braxou E., Nychas G.J. ve Giaouris E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied Environmental Microbiology*, ***78***, 2586–2595.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. ve Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, ***3*****(4)**, a010306.

Kretli, L. (2016). Microbial Biofilms: The Challenge of Food Industry. *Biochemistry and Molecular Biology Journal*, ***1*****(1-5),** 1-3.

Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T. ve Marchand, C. (2008). Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: a review. *Aquatic Botany*, ***89*****(2**), 201-219.

Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y. ve Lisichkin, G. V. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, ***77*****(3),** 233.

Kukushkina, E. A., Hossain, S. I., Sportelli, M. C., Ditaranto, N., Picca, R. A. ve Cioffi, N. (2021). Ag-based synergistic antimicrobial composites. A Critical Review. Nanomaterials, ***11*****(7),** 1687.

Kumar, C. G. ve Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, ***42*****(1-2),** 9-27.

Kyaw, K., Harada, A., Ichimaru, H., Kawagoe, T., Yahiro, K., Morimura, S.,ve ark. (2017). Silver Nanoparticles as Potential Antibiofilm Agents Against Human Pathogenic Bacteria. *Chemistry Letters*, ***46*****(1-3**), 594.

Lasa, I. ve Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, ***157*****(2)**, 99-107.

Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J. R. ve Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, ***58*****(5),** 1322-1339.

Lazar, V. (2011) Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, ***17*****(6)**, 280-285.

Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends in Microbiology*, ***11*****(4),** 179-184.

Lembre, P., Lorentz, C. ve Di Martino, P. (2012). Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. İçinde *The Complex World of Polysaccharides*, London, UK: IntechOpen; 371-392. DOI:10.5772/51213

Lewinski, N., Colvin, V. ve Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, ***4*****(1),** 26-49.

Liberto, M. C., Matera, G., Quirino, A., Lamberti, A. G., Capicotto, R., Puccio, R. ve ark. (2009). Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. *Microbiological Research*, ***164*****(5)**, 522-528.

Lim, E. S., Lee, J. E., Kim, J. S. ve Koo, O. K. (2017). Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie****, 77***, 376-382.

Lin, C. M., Moon, S. S., Doyle, M. P. ve McWatters, K. H. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxideand lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. Journal of Food Protection, ***65***, 1215–1220.

Lindsay, D. ve Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, ***64*****(4)**, 313-325.

López-Gálvez, F., Randazzo, W., Vásquez, A., Sánchez, G., Decol, L.T., Aznar, R., Gil, M. ve Allende, A. (2018). Irrigating Lettuce with Wastewater Effluent: Does Disinfection with Chlorine Dioxide Inactivate Viruses? *Journal of Environmental Quality*, ***47***, 1139-1145.

Lory, S. (1992). Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, ***174*****(11**), 3423.

Ludensky, M. (2003). Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, ***51*****(4),** 255-263.

Lynch, D.J., Fountain, T.L., Mazurkiewicz, J.E. ve Banas, J.A. (2007). Glucanbinding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiology*, ***268*****(2),** 158–165.

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K. ve Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*, ***5*****(3),** e1000354.

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. ve Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of

Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of Bacteriology*, ***178*(1),** 175-183.

Mafu A. S., Roy, D., Goulet, J. ve Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection, **53***, 742 - 746.

Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. ve O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. *Nature*, ***426*(6964),** 306-10.

Majed, R., Faille, C., Kallassy, M. ve Gohar, M. (2016). Bacillus cereus biofilms – same, only different. *Frontiers in Microbiology*, ***7***, 1054.

Malaeb, L., Katuri, K.P., Logan, B.E., Maab, H., Nunes, S.P. ve Saikaly, P. E. (2013). A hybrid microbial fuel cell membrane bioreactor with a conductive ultrafiltration membrane biocathode for wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, ***47*** **(20),** 11821-11828

Marambio-Jones, C. ve Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, ***12*(5),** 1531-1551.

Marcinkiewicz, J., Strus, M. ve Pasich, E. (2013). Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilmassociated chronic infections. *Polish Archives of Internal Medicine*, ***123*(6)**, 309-13.

Markowska, K., Grudniak, A. M. ve Wolska, K. I. (2013). Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica*, ***60*(4**), 523-530.

Markowska, K., Grudnıak, A., Mılczarek, B. ve Wolska, K. (2018). The effect of silver nanoparticles on *Listeria monocytogenes* pcm2191 peptidoglycan metabolism and cell permeability. *Polish Journal of Microbiology*, ***67***, 315-320.

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. ve Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ***11***, 133-147.

Martí, M., Trotonda, M. P., Tormo-Más, M.A., Vergara-Irigaray, M., Cheung, A. L., Lasa, I. ve Penadés, J. R. (2010) Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, ***12*****(1)**, 55-64.

McBain, A.J., Bartolo, R.G., Catrenich, C.E., Charbonneau, D., Ledder, R.G. ve Gilbert, P. (2003). Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of in vitro plaque ecosystems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, ***47***, 3531–3538.

McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. ve Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, ***10*****(1)**, 39-50.

McFeters, G. A., Kıppın, J. J. ve Lechevallıer, M. W. (1986). Injured coliforms in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, ***51,*** 1-5.

McKenzie, K., Maclean, M., Timoshkin I. V., Endarko, E., MacGregor, S. J. ve Anderson, J. G. (2013). Photoinactivation of bacteria attached to glass and acrylic surfaces by 405 nm light: potential application for biofilm decontamination. *Photochemistry and Photobiology*, ***89*****(4)**, 927-35.

McLandsborough, L. A. (2015). Current Knowledge and Perspectives on Biofilm Formation and Remediation. İçinde A.L. Pometto and A. Demirci (Ed.), Biofilms in the Food Environment. London: John Wiley & Sons, Ltd; 1-28.

Melo, L. F. (2003). Biofilm formation and its role in fixed film processes. İçinde: Mara, D. ve Horan, N. (Ed.), *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. London, UK:Academic Press; 337-349.

Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration ve Biodegradation*, ***51*****(4)**, 249-253.

Miao, L., Hou, J., You, G., Liu, Z., Liu, S., Li, T. ve ark.(2019). Acute effects of nanoplastics and microplastics on periphytic biofilms depending on particle size, concentration and surface modification. *Environmental Pollution*, ***255*****(2**), 113300.

Midelet, G. ve Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, ***97***, 262–270.

Miller, G., Lowrey, N. ve Senjen, R. (2008). *Out of the laboratory and on to our plates: Nanotechnology in Food ve Agriculture*. Friends of the Earth. Erişim: 16.07.2020,

http://www.foe.org/system/storage/877/b5/4/547/Nanotechnology_in_food_and_agriculture_-_web_resolution.pdf

Mizan, M. F. R., Jahid, I. K. ve Ha, S. D. (2015). Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiology*, ***49***, 41-55.

Mohammed, A. N., (2019). Resistance of bacterial pathogens to calcium hypochlorite disinfectant and evaluation of the usability of treated filter paper impregnated with nanosilver composite for drinking water purification. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, ***16,*** 28-3

Mohammed, A.N. ve Abdel Aziz, S.A.A. (2019). Novel approach for controlling resistant *Listeria monocytogenes* to antimicrobials using different disinfectants types loaded on silver nanoparticles (Ag NPs). *Environmental Science of Pollution Resarch*, ***26,*** 1954–1961.

Mohanta, Y. K., Panda, S. K., Bastia, A. K. ve Mohanta, T. K. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Protium serratum* and investigation of their potential impacts on food safety and control. *Frontiers in Microbiology*, ***8,*** 626.

Molin S. ve Tolker-Nielsen T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, ***14*****(3)**, 255-61.

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A. ve Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control*, ***40***,329–334.

Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K. ve Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among *staphylococci* from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, ***69*****(9),** 5648–5655.

Møretrø, T., Vestby, L. K., Nesse, L. L., Storheim, S. E., Kotlarz, K. ve Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, ***106*****(3),** 1005-1012.

Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L. L., Vestby, L. K. ve Langsrud, S. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, ***45***, 532–544.

Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E. ve Kogure, K. (1999). The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology*, ***145*(10),** 2797-2802.

Mortensen, B. K. (2014). Problems caused by biofilms.Erişim 20.07.2020, https://www.bactoforce.se/wp-content/uploads/2014/09/Problems-caused-by-biofilms.pdf

Motarjemi, Y. ve Lelieveld, H. (2014). Fundamentals in management of food safety in the industrial setting: challenges and outlook of the 21st century. İçinde *Food safety management*. London: Academic Press;1-20.

Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.M. ve Ghannoum M.A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, ***71***, 4333–4340.

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. ve Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, ***4*(11).**

Müller, P., Guggenheim, B. ve Schmidlin, P. R. (2007). Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, ***115*(1)**, 77-80.

Mullerat, J., Sheldon, B. W. ve Klapes, N. A. (1995). Inactivation of *Salmonella* species and other food-borne pathogens with salmide®, a sodium chlorite–based oxyhalogen disinfectant. *Journal of Food Protection*, ***58* (5),** 535–540.

Myszka, K. ve Czaczyk, K. (2017). Characterization of adhesive exopolysaccharide (EPS) produced by *Pseudomonas aeruginosa* under starvation conditions. *Current Microbiology*, ***58*(6)**, 541-546.

Nafisi, S. ve Maibach, H.I. (2017). Nanotechnology in Cosmetics, İçinde Sakamoto, K., Lochhead, R.Y., Maibach, I. H. ve Yamashita, Y. (Ed.), *Cosmetic Science and Technology*. London: Elsevier; 337-369.

Namasivayam, K.R., Bharani, R. S. A. ve Ansari, M. R. (2013). Natural occurrence of potential fungal biopesticide Nomuraea Rileyi (Farlow) Samson associated with agriculture fields of Tamil Nadu, India and it's compatibility with metallic nanoparticles. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, ***4***, 132.

Nia, J.R. (2007). Using of nanosilver in poultry, livestock and aquatics ındustry. Google Patents, 2007.

Nile, S. H., Baskar, V., Selvaraj, D., Nile, A., Xiao, J. ve Kai, G. (2020). Nanotechnologies in food science: applications, recent trends and future perspectives. *Nano-Micro Letters, **12*(1),** 45.

Novick R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. ve Moghazeh, S. (1996). The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Genetics and Genomics*, ***248*(4)**, 446-58.

Nwodo, U. U., Green, E. ve Okoh A. I. (2012) Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, ***13*(11)**, 14002-14015.

Okshevsky, M. ve Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, ***41*(3),** 341-52.

O'Toole, G. A. ve Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, ***30*(2),** 295-304.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. ve Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, ***54*(1),** 49-79.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, ***64***, 175-188.

Özer, B. (2016), Biyofilm oluşumu ve süt endüstrisi için önemi, Erişim 09.07.2020 https://www.sutdunyasi.com/kose-yazilari/sut-bilimi/biyofilm-olusumu-ve-sut-endustrisi-icin-onemi/

Xavıer, P. B., Vıeıra, H. D. ve Guımarães, C. P. (2015). Physiological potencial of stylosanthes cv. Campo Grande seeds coated with different materials. *Journal of Seed Science*, ***37*(2)**, 117-124.

Palmer, J., Flint, S. ve Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of İndustrial Microbiology and Biotechnology*, ***34*(9),** 577-588.

Pan Y., Breidt F. ve Kathariou S. (2002). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied Environmental. Microbiology*, ***72,*** 7711–7717.

Pan, M., Zhu, L., Chen, L., Qiu, Y. ve Wang, J. (2016). Detection techniques for extracellular polymeric substances in biofilms: a review. *BioResources, **11*****(3),*** 8092-8115.

Pasmore, M., Todd, P., Pfiefer, B., Rhodes, M. ve Bowman, C. N. (2002). Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. *Biofouling*, ***18*****(1)**, 65-71.

Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. ve Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology*, ***48*****(1**), 585-617.

Percival, A.E., Wendel, J.F. ve Stewart, J.M., (1999). Taxonomy and germplasm resources. İçinde: Smith, W.C. ve Cothren, J.T. (Ed.), *Cotton: Origin, History, Technology and Production*. New York: John Wiley & Sons; 33-63.

Pereda, M., Marcovich, N.E. ve Ansorena, M.R. (2019). Nanotechnology in Food Packaging Applications: Barrier Materials, Antimicrobial Agents, Sensors, and Safety Assessment. İçinde: Martínez, L., Kharissova, O. ve Kharisov, B. (Eds.), *Handbook of Ecomaterials*. Cham: Springer; 2036-2052.

Pereira, A., Mendes, J. ve Melo, L. F. (2008). Using nanovibrations to monitor biofouling. *Biotechnology and Bioengineering*, ***99*****(6**), 1407-1415.

Perez, M. (2012). Effects of Silver Nanoparticles on Wastewater Treatment and *Escherichia Coli* Growth.

Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews, **58*****(4**), 755-805.

Poulsen, L. V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Science and Technology*, ***32*****(6)**, 321-326.

Prema, P. ve Raju, R. (2009). Fabrication and characterization of silver nanoparticle and its potential antibacterial activity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, ***14,*** 842–847.

Radhakrishnan, V. S., Reddy Mudiam, M. K., Kumar, M., Dwivedi, S. P., Singh, S. P. ve Prasad, T. (2018). Silver nanoparticles induced alterations in multiple cellular

targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *International Journal of Nanomedicine*. ***13***, 2647-2663.

Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova,V. A. ve Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surface B Biointerfaces*, ***102***, 300–306.

Rai, M., Yadav, A. ve Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, ***27***, 76-83.

Ramachandran, R.ve Sangeetha, L. (2017). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm forming multidrug resistant clinical isolates. *The Pharma Innovation Journal*, ***6***, 39- 43.

Rao, C.N. R., Müller, A. ve Cheetham, A. K. (2005). *The Chemistry of Nanomaterials.* Weinheim: Wıley-Vch Verlag GmbH & Co.

Ravichandran, R. (2010). Nanotechnology applications in food and food processing: innovative green approaches, opportunities and uncertainties for global market. *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, ***1*****(2**), P72-P96.

Rella, A., Farnoud, A. M. ve Del Poeta, M. (2016). Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in Lipid Research*, ***61***, 63-72.

Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M. ve Ng, P. K. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***54*****(16**), 5814-5822.

Ríos-Castillo, A. G., González-Rivas, F. ve Rodríguez-Jerez, J. J. (2017). Bactericidal efficacy of hydrogen peroxide-based disinfectants against Gram-positive and Gram-negative bacteria on stainless steel surfaces. *Journal of Food Science*, ***82*****(10)**, 2351-2356.

Ron, E. Z. ve Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. Environmental Microbiology, ***3*****(4),** 229-236.

Rowlett, V. W., Mallampalli, V. K., Karlstaedt, A., Dowhan, W., Taegtmeyer, H., Margolin, W. ve Vitrac, H. (2017). Impact of membrane phospholipid alterations in

Escherichia coli on cellular function and bacterial stress adaptation. *Journal of Bacteriology*, ***199*****(13),** e00849-16.

Rutherford, S. T. ve Bassler, B. L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, ***2*****(11):** a012427

Salunke, G. R., Ghosh, S., Santosh Kumar, R. J., Khade, S., Vashisth, P., Kale, T. ve ark (2014). Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant Plumbago zeylanica and their application in biofilm control. *International Journal of Nanomedicine*, ***9***, 2635–2653.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J.W. ve Davies, D.G.(2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, ***184*****(4),** 1140-1154.

Schmitt J. ve Flemming H.C. (1999); Water binding in biofilms. *Water Science and Technology*, ***39***, 77–82.

Seed, R. ve Hughes, R. N., (1995). Criteria for prey size-selection in molluscivorous crabs with contrasting claw morphologies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, ***193*****(1–2),** 177-195.

Sheldon, B. W. ve Brake, J. (1991). Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poultry Science*, ***70*****(5**), 1092-1098.

Sharma, V. K., Yngard, R. A. ve Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, ***145*****(1-2)**, 83-96.

Sharma, M. ve Anand, S. K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, ***19*****(6)**, 627-636.

Shi, H., Colavin, A., Lee, T. K. ve Huang, K. C. (2017). Strain Library Imaging Protocol for high-throughput, automated single-cell microscopy of large bacterial collections arrayed on multiwell plates. *Nature Protocols*, ***12*****(2**), 429-438.

Shi, X. ve Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, ***20*****(9),** 407-413.

Shin, W. K., Cho, J., Kannan, A. G., Lee, Y. S. ve Kim, D. W. (2016). Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO 2 nanoparticles for lithium-ion polymer batteries. *Scientific Reports*, **6**, 26332.

Siddiqi, K. S., Husen, A. ve Rao, R. A. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, ***16*****(1),** 14.

Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O. ve Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, ***84*****(4),** 338-345.

Simões, M., Simões, L. C. ve Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - *Food Science and Technology*, ***43*****(4)**, 573-583.

Sinde, E. ve Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella spp*. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, ***17*****(4)**, 439-447.

Singh, M., Singh, S., Prasad, S. ve Gambhir, I. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, ***3*****(3),** 115-122.

Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N. ve Paluszak, Z. (2018). Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*, ***21***, 23–33.

Sintim, H.Y., Zheljazkov, V.D., Obour, A.K., Garcia y Garcia, A. ve Foulke, T.K. (2015). Influence of nitrogen and sulfur application on camelina performance under dryland conditions. *Industrial Crops and Products*, ***70***, 253–259.

Smith, J. L., Fratamico, P. M. ve Novak, J. S. (2004). Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, ***67*****(5)**, 1053-1070.

Sofos, J. N. (2009). Biofilms: our constant enemies. Food Safety Magazine, ***38***, 40–41. Erişim: 21.07.2020 https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2009/biofilms-our-constant-enemies/

Sofos, J. N. ve Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, ***86*****(1)**, 2-14.

Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. ve Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology, **43*(3)**, 793-808.

Sondi I., ve Salopek-Sondi B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid Interface Science, **275*(1),** 177–182.

Song, H. Y., Ko, K. K., Oh, I. H. ve B. T. Lee (2006). Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *European Cells and Materials. **11***, 58.

Spoering, A. L. ve Gilmore, M. S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology, **9*(2)**, 133-137.

Srey, S., Jahid, I. K. ve Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control, **31*(2)**, 572-585.

Starkey, M., Lepine, F., Maura, D., Bandyopadhaya, A., Lesic, B., He, J. ve ark. (2014). Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathogens*, ***10*(8**), e1004321.

Steinberger, R. E. ve Holden, P. A. (2005). Extracellular DNA in single-and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology, **71*(9**), 5404-5410.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. ve Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis, **115*(8)**, 891-899.

Stewart, P. S. (2001). Multicellular resistance: biofilms. *Trends in Microbiology, **9*(5),** 204.

Stickler, D. J., Morris, N. S., McLean, R. J. ve Fuqua, C. (1998). Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, ***64*(9)**, 3486–3490.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. ve Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology, **56*(1)**, 187-209.

Su, H. L., Chou, C. C., Hung, D. J., Lin, S. H., Pao, I. C., Lin, J. H. ve ark. (2009). The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. *Biomaterials*, ***30*****(30),** 5979-5987.

Sutherland, I.W. (1990). Biotechnology of microbial exopolysaccharides. İçinde: *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge, Cambridge University Press: 12-117.

Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, ***147*****(1),** 3-9.

Sylla, P., Bordeianou, L.G., Berger, D. ve ark. (2013). A pilot study of natural orifice transanal endoscopic total mesorectal excision with laparoscopic assistance for rectal cancer. *Surgical Endoscopy*, ***27***, 3396–3405.

Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ***65*****(9),** 1842-1852.

Tamayo, L.A., Zapata, P.A., Vejar, N.D., Azócar, M.I., Gulppi, M.A., Zhou ve ark. (2014). Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. *Materials Science and Engineering C*, ***40***, 24-31.

Téllez, S. (2010). Biofilms and their impact on food industry. *VISAVET Outreach Journal*. Erişim: 22.07.2020, https://www.visavet.es/en/articles/biofilms-impact-food-industry.php

Thomas, C. M. ve Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, ***3*****(9**), 711.

Tormo, M. A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I. ve Penades, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. *Microbiology*, ***151*****(7)**, 2465-2475.

Toulmay, A. ve Schneiter, R. (2007). Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie*, ***89*****(2)**, 249-254.

Ungvarsky, J. (2018). Biofilm, Salem Press Encyclopedia of Science.Erişim: 24 Mayıs 2019, http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87323217&lang=tr&site=eds-live

Trachoo N. (2003). Biofilms and the food industry. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, ***25* (6)**, 807-815.

USDA, (2016, 15 Mart). HACCP Seven Principles. Erişim: 15.08.2020. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9bef6a34-d7ef-441e-8478-f431aee441cf/16_IM_HACCP_Principles.pdf?MOD=AJPERES

Ünal D. ve Tayfur M., (2017). Biofilm. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, ***21*(2)**, 108-114.

Van Houdt, R. ve Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, ***109*(4)**, 1117-1131.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. ve Zehnder, A. J. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, ***53*(8)**, 1898-1901.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W. ve Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, ***54*(1)**, 75-87.

Veasey, S. ve Muriana, P. (2016). Evaluation of electrolytically-generated hypochlorous acid ("electrolyzed water") for sanitation of meat and meat-contact surfaces. *Foods*, ***5*(4),** 42.

Venkitanarayanan, K. S., Ezeike G. O. ve Hung, Y. C. (1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli o157:h7, Salmonella* Enteritidis *and Listeria monocytogenes*. *Applied and Environment Microbiology*, ***65*(9)**, 4276-4279.

Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. M., Bailey, H. ve Doyle, M. P. (2002). Inactivation of *Escherichia coli O157:H7, Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid withhydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, ***65***, 100–105.

Verran, J. ve Jones, M. V. (2000). Problems of Biofilms in the Food and Beverage Industry. İçinde: Walker, J., Surmann, S. ve Jass, J. (Eds.), *Industrial Biofouling Detection, Prevention and Contro*l. Chichester: Wiley;145–173.

Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. ve Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. *BMC Veterinary Research*, ***5*(1)**, 20.

Videla, H. A. ve Herrera, L. K. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, ***8*****(3),** 169.

Vlassova, N., Han, A., Zenilman, J. M., James, G. ve Lazarus, G. S. (2011). New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. *British Journal of Dermatology*, ***165*****(4),** 751-759.

Wang, L., Hu, C. ve Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, ***12***, 1227–1249.

Wang, H., Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Yang, X., Ali, M. A. ve ark. (2018). Silver nanoparticles: A novel antibacterial agent for control of *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Dairy Science*, ***101*****(12),** 10775-10791.

Wang, R., Zhou, Y., Kalchayanand, N., Harhay, D. M. ve Wheeler, T. L. (2020). Effectiveness and functional mechanism of a multicomponent sanitizer against biofilms formed by *Escherichia coli* O157:H7 and five *Salmonella* serotypes prevalent in the meat ındustry. *Journal of Food Protection*, ***83*** **(4),** 568–575.

Wareing, P. (2010). *HACCP: A toolkit for implementation.* Surrey: Leatherhead Pub.

Watanabe, M., Sasaki, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Noparatnaraporn, N. ve Nishio, N. (1998). Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sp*.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, ***50*****(6),** 682-691.

Watnick, P. ve Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, ***182*****(10)**, 2675-2679.

Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. ve Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, ***295*****(5559)**, 1487-1487.

Whitehead, K. A. ve Verran, J. (2015) Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion In Food Science*, ***2,*** 84–91.

WHO (2015, 3 Aralık). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2015, S: 1–252. Erişim:22.07.2020, https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/

Wicker-Böckelmann, U., Wingender, J. ve Winkler, U. K. (1987). Alginate lyase releases cell-bound lipase from mucoid strains of *Pseudomonas*

aeruginosa. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, ***266*****(3-4),** 379-389.

Wildbrett, G. ve Escobar, J. E. (Eds.). (2000). Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Zaragoza, Spain: Editorial Acribia.

Wilking, J., Angelini, T., Seminara, A., Brenner, M. ve Weitz, D. (2011). Biofilms as complex fluids. *MRS Bulletin*, ***36*****(5)**, 385-391.

Williams, M. M., ve Braun-Howland, E. B. (2003). Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology*, ***69*****(9),** 5463–5471.

Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J. ve ark. (2017). Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini review. *Research and Reviews. Journal of Engineering and Technology*, ***6*****(4).**

Wimpenny, J., Manz, W. ve Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, ***24*****(5),** 661-671.

Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances? Içinde: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C., (ed). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Berlin: Springer: 1–20.

Wingender, J. ve Jaeger, K.E. (2002). Extracellular enzymes in biofilms. İçinde Bitton, G., (Ed.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, New York: Wiley: 1207–1223.

Wirtanen, G., Saarela, M. ve Mattila-Sandholm, T. (2000). Biofilms - Impact on Hygiene in the Food Industries. İçinde. Bryers, J. D. (Ed.), *Biofilms II: Process Analysis and Applications*, S. 327-372.

Wong, H. S., Townsend, K. M., Fenwick, S. G., Maker, G., Trengove, R. D. ve O'Handley R. M. (2010). Comparative susceptibility of *Salmonella Typhimurium* biofilms of different ages to disinfectants. *Biofouling*, ***26***, 859–864.

Wu, S., Baum, M. M., Kerwin, J., Guerrero, D., Webster, S., Schaudinn, C. ve ark. (2014). Biofilm-specific extracellular matrix proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Pathogens and Disease*, ***72*****(3)**, 143-160.

Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Wang, Y., Aguilar, Z. P. ve Wei, H. (2012). Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *Biometals*, ***25***, 45–53.

Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M. ve Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, ***153*****(5)**, 1318-1328.

Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R. ve Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, ***19*****(4)**, 1114.

Young, K.T., Davis, L.M. ve Dirita, V.J. (2007) *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, ***5***, 665–679**.**

Yun, H. S., Kım,Y., Oh, S., Jeon, W. M., Frank, J. F. ve Kım, S. H. (2012). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* biofilms and planktonic cultures to hydrogen peroxide in food processing environments. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, ***76*****(11),** 2008–2013.

Zarei, M., Jamnejad, A. ve Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, ***7*****(1),** e8720.

Zhang, T. C. ve Bishop, B. L. (1994). Density, porosity, and pore structure of biofilms. Water Research, ***28*** **(11)**, 2267-2277.

Zhang, S. ve Farber, J.M. (1996). The effects of various disinfectants *against Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, ***13*****(4),** 311-321.

Zhang, X. Q., Bishop, P. L. ve Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology****, 37***, 345–348.

Zhang, T., Fang, H. H. P. ve Ko, B. C. B. (2003). Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, ***63*****(1)**, 101-106.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W. ve Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, ***17*****(9)**, 1534.

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J. ve Zhong, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, ***7*****(58)**, 36670-36683.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Gıda işletmelerinde patojenler tarafından oluşturulmuş biyofilmler üzerine nanoteknolojik dezenfektanların etkisi

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%8	%3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
2	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	<%1
6	tmc.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
7	www.dokapsempozyum.org İnternet Kaynağı	<%1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1