

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİDYE KABUĞU TOZUNUN PASLANMAZ ÇELİK  
YÜZEYLERDE OLUŞAN BİYOFİLM TEMİZLEME  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gıda. Müh. Tülay DURAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Arzu Ç. MEHMETOĞLU**

**Ocak 2011**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİDYE KABUĞU TOZUNUN PASLANMAZ ÇELİK  
YÜZEYLERDE OLUŞAN BİYOFİLM TEMİZLEME  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

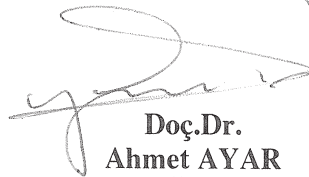
**Gıda. Müh. Tülay DURAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

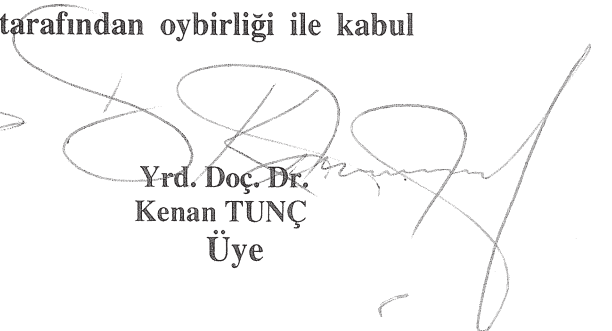
**Bu tez 10 / 01 / 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.**



**Yrd.Doç.Dr.  
Arzu Ç. MEHMETOĞLU  
Jüri Başkanı**



**Doç.Dr.  
Ahmet AYAR  
Üye**



**Yrd. Doç. Dr.  
Kenan TUNÇ  
Üye**

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca araştırmanın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında bana yol gösteren ve destek veren, değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasındaki desteğinin yanında, sonsuz ilgi, sabır ve manevi desteğini de esirgemeyen sevgili eşim, bölümümüz Araştırma Görevlisi Hüseyin DURAN'a,

Deneysel çalışmalarım esnasında desteğini gördüğüm bölümümüz Sayın Araştırma Görevlisi Güliz YALDIRAK'a, Sayın Gıda Müh. Hamza BOZKIR' a,

Değerli katkılarından ve desteklerinden dolayı, yüksek lisans tez jürimde yer alan Sayın Doç. Dr. Ahmet AYAR'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ' a,

İlgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Nurcan BODUR, ağabeylerim Mahmut ve Ayhan BODUR'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Destek ve katkılarından dolayı, Milkon Süt ve Gıda Mamülleri San. ve Tic. A.Ş.' nin Genel Müdürü Sayın Rıdvan KUŞ'a, Z&B Bozkırlar Et Ürünleri Topt. ve Per. Tic. çalışanlarına, Mısırlıoğlu İmal. San. ve Tic. Ltd. Şti. yöneticilerinden Sayın Sencer MISIRLIOĞLU'na, Vegi Doğal Hijyen Paz. Gıda. San. ve Tic. Ltd. Şti. yetkililerine,

Araştırmamıza maddi desteklerinden dolayı Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına ve Mühendislik Fakültesi Dekanlığına sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Saygılarımla,

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
2.1. Biyofilm.....	8
2.1.1. Biyofilmin tanımı.....	8
2.1.2. Biyofilm yapısı ve genel özellikleri.....	9
2.1.2.1. Hücre dışı polimerik maddeler (EPS).....	9
2.1.2.2. EPS' nin genel özellikleri.....	11
2.1.2.3. EPS biyosentezi.....	12
2.1.3. Biyofilm yapısı.....	13
2.1.4. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler.....	15
2.1.5. Biyofilm oluşum mekanizması.....	15
2.1.5.1. Dönüşümlü tutunma.....	15
2.1.5.2. Dönüşümsüz tutunma.....	16
2.1.5.3. Öncü bakterinin tutunması ve mikrokoloni oluşumu...	17
2.1.5.4. Biyofilm oluşumu.....	17

2.1.5.5. Kopma ve ayrılma.....	17
2.1.6. Gen transferi.....	18
2.1.7. Mikrobiyel populasyon etkileşimi (quorum sensing).....	19
2.1.8. Biyofilmde antimikrobiyel direnç.....	20
2.2. Biyofilm Kaynaklı Problemler.....	22
2.2.1. Patojenlerin oluşturduğu biyofilmler.....	22
2.2.2. Biyofilmde bakteriyofaj.....	23
2.2.3. Biyofilm kaynaklı endüstriyel kayıplar.....	24
2.3. Et ve Süt İşletmelerinde Biyofilm.....	25
2.3.1. Et ve süt işletmelerinde <i>Listeria monocytogenes</i> biyofilmi.	25
2.3.2. Et ve süt işletmelerinde <i>Staphylococcus aureus</i> biyofilmi...	27
2.3.3. Et ve süt işletmelerinde <i>Esherichia coli</i> O157:H7 biyofilmi.....	29
2.4. Biyofilmin Önlenmesi.....	30
2.4.1. Biyofilmin tespiti.....	32
2.4.2. Kimyasallarla biyofilmin önlenmesi.....	33
2.4.3. Biyofilmin önlenmesi için HACCP uygulamaları.....	38
2.5. Midye Kabuğu Tozu (MKT).....	38

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOD.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.2. Metod.....	43
3.2.1. Bakterilerin İnokulasyonu.....	43
3.2.2. Peynir altı suyu ve et tezgahı yıkama sularının hazırlanması.....	43
3.2.3. Paslanmaz çeliğe tutunma.....	44
3.2.4. Kurutma.....	44
3.2.5. Midye kabuğu tozunun uygulanması.....	44
3.2.6. Mikroorganizma izolasyonu.....	46
3.2.7. İstatistiksel değerlendirmeler.....	47

BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR.....	48
4.1. Paslanmaz Çeliğe Tutunma.....	48
4.2. Midye Kabuğu Tozunun Biyofilm Temizliğine Etkisi.....	49
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	59
5.1. Paslanmaz Çeliğe Tutunma.....	59
5.2. Midye Kabuğu Tozunun Biyofilm Temizleme Etkisi ve Biyofilm Kontrolü.....	62
KAYNAKLAR.....	67
EKLER.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	90

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AHL	: Acyl homoserin lakton
ATP	: Adenozin trifosfat
aw	: Su aktivitesi
BAP	: Biofilm associated protein ( Biyofilm Birleşmiş Protein )
BC	: Benzalkonyum klorid
BWW	: Bench washing water ( Tezgah Yıkama Suyu)
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
Ca(OCl) <sub>2</sub>	: Kalsiyum hipoklorit
CaCO <sub>3</sub>	: Kalsiyum karbonat
CaO	: Kalsiyum oksit
CFU	: Colony-forming unit
CIP	: Cleaning in place ( yerinde temizlik)
ClO <sub>2</sub>	: Klor dioksit
cm <sup>2</sup>	: Santimetrekaare
dak	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPS	: Extracellular polymeric substances (Hücre Dışı Polimerik Madde)
ETSY	: Et tezgahı yıkama suyu
g	: Gram
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Point (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları)
HOCl	: Hipoklorik asit
KAB	: Kuarterner amonyum bileşikleri
kob	: Koloni bakteri

l	: Litre
log	: Logaritmik birim
mg	: Miligram
min	: Minute (dakika)
MKT	: Midye kabuğu tozu
ml	: Mililitre
MPE	: Mikrobiyel populasyon etkisi ( Microbial population effect)
N	: Azot
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ni	: Nikel
OH	: Hidroksit
P	: Fosfor
PAS	: Peynir altı suyu
PO <sub>4</sub>	: Fosfat
ppm	: Parts per million (Milyonda bir)
PTFE	: Politetrafloroetilen
QS	: Quarum sensing
sa	: Saat
sn	: Saniye
SSP	: Scallop shell powder (Midye kabuğu tozu)
ssp	: Subspecies (alttür)
TSA	: Tryptic soy agar
TSB	: Tryptic soy broth
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1a.	EPS yapısı.....	10
Şekil 2.1b.	EPS içindeki basiller.....	11
Şekil 2.2.	Biyofilm mimarisine örnek.....	13
Şekil 2.3.	Biyofilm gelişimi.....	18
Şekil 3.1.	Sterilize edilmiş tezgah yıkama suyu ve peynir altı suyu.....	43
Şekil 3.2.	Paslanmaz çelik plakaların daldırıldığı steril su, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltileri .....	45
Şekil 3.3.	Paslanmaz çelik plakaları swaplama tekniği .....	46
Şekil 4.1.	Midye kabuğu tozunun 1 dakikalık muamelesinde, peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	51
Şekil 4.2.	Midye kabuğu tozunun 1 dakikalık muamelesinde, tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi ....	52
Şekil 4.3.	Midye kabuğu tozunun 5 dakikalık muamelesinde, peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	53
Şekil 4.4.	Midye kabuğu tozunun 5 dakikalık muamelesinde, tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	54
Şekil 4.5.	Midye kabuğu tozunun 10 dakikalık muamelesinde peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	55
Şekil 4.6.	Midye kabuğu tozunun 10 dakikalık muamelesinde, tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	56

Şekil 4.7a.	Yıkanmamış, steril su ile yıkanmış ve MKT çözeltisinin %0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış <i>L. monocytogenes</i> 'in gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları.....	57
Şekil 4.7b.	Yıkanmamış, steril su ile yıkanmış ve MKT çözeltisinin %0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış <i>E.coli</i> O157:H7'in gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları.....	57
Şekil 4.7c.	Yıkanmamış, steril su ile yıkanmış ve MKT çözeltisinin %0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış <i>S.aureus</i> 'un gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları.....	58

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Paslanmaz çelik plakalarda oluşan <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> biyofilmlerine karşı uygulanmış midye kabuğu tozu (MKT) konsantrasyonları ve uygulama zamanları.....	44
Tablo 4.1.	Peynir altı suyu ve tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> hücre sayıları.....	48
Tablo 4.2.	Midye kabuğu tozu çözeltisinin peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> hücrelerini temizleme etkisi.....	49
Tablo 4.3.	Midye kabuğu tozu çözeltisinin et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> hücreleri temizleme.....	50

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Midye kabuğu tozu, patojen, biyofilm, paslanmaz çelik

Son yıllarda *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* O157:H7 biyofilmleri süt ve et işletmelerinde metal yüzeylerde tehlike oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada, midye kabuğu tozunun (MKT) paslanmaz çelikte geliştirilmiş bu patojenlerin biyofilmini temizleme etkisi araştırılmıştır.

Bir gün önceden kültürlenmiş *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 ( $9 \log_{10}$ kob/ml), süt ve et işletmelerinden temin edilmiş peynir altı suyu (PAS) ve et tezgahı yıkama suyuna (ETYS) aşılacaktır. Paslanmaz çelik plakalar ( $10 \text{ cm}^2$ ) aşılacak sıvılara yerleştirilmiş ve yüzeyde biyofilm oluşturması için  $20^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonra, plakalar sırasıyla kurutulup, steril suyla yıkandıktan sonra, 1, 5 ve 10 dak boyunca steril suya, %0.25 ve 0.50 MKT çözeltilerine batırılmış ve plakalar üzerindeki hücre sayısı belirlenmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki, 1 dak işlem süresinde %0.25 ve 0.50 MKT çözeltileri plakalardaki *L. monocytogenes* hücrelerini  $4 \log_{10}$ kob/ $\text{cm}^2$  azaltmıştır. Bunun yanında 1 dak işlem süresinde %0.50 MKT çözeltileri *S. aureus* hücrelerini, PAS'de inkübe edilmiş plakalarda  $5 \log_{10}$ kob/ $\text{cm}^2$  azaltmıştır. Buna ek olarak, PAS ve ETYS'de oluşan *E. coli* O157:H7 biyofilmi %0.50 MKT çözeltisinin 5 dak uygulamasında sırasıyla  $6 \log_{10}$ kob/ $\text{cm}^2$  ve  $4 \log_{10}$ kob/ $\text{cm}^2$  temizlenmiştir. İşlem süresi istatistiksel bakımdan SSP'nin etkisini değiştirmemiştir ( $p>0.05$ ). Aynı zamanda, MKT'nin konsantrasyonundaki artış temizleme etkisini, istatistiksel olarak arttırmıştır ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak, kullanılan MKT çözeltisi paslanmaz çelikteki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 biyofilmlerini önemli ölçüde temizlemiş olduğu için, gıda endüstrisinde gelişen biyofilmi temizlemek için alternatif bir dezenfektan olarak kullanılabilir.

# INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SCALLOP SHELL POWDER ON CLEANING BIOFILM FORMING ON STAINLESS STEEL SURFACES

## SUMMARY

Keywords: Scallop shell powder, pathogen, biofilm, stainless steel plate

The last decades, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms emerged a threat for dairy and meat industries on steel surfaces. In this study, the effect of scallop shell powder (SSP) on removing biofilm of these pathogens from stainless steel plates has been examined.

Whey and bench washing water (BWW) provided from dairy and meat factories, respectively, were inoculated by *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 ( $9 \log_{10} \text{kob/ml}$ ). Stainless steel plates ( $10 \text{ cm}^2$ ) were placed in inoculated fluids and incubated at  $20^\circ\text{C}$  at 48 hours to form biofilm. Then, the plates were dried, washed by sterile water, dipped in sterile water, 0.25 and 0.50% SSP slurries for 1, 5 and 10 min and determined the number of cells on the plates. The results showed that 0.25 and 0.50% SSP reduced the number of *L. monocytogenes* on the plates  $4 \log_{10} \text{kob/cm}^2$ . Application of 0.50% SSP for 1 min also removed *S. aureus* by  $5 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  from the plates incubated in whey. Furthermore, biofilm of *E. coli* O157:H7 formed in whey or BWW was cleaned by  $6 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  and  $4 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  using 0.50% SSP for 5 min, respectively. Treatment time didn't change effect of SSP ( $p > 0.05$ ). Also, increasing concentration of SSP significantly increased its reduction effect against tested pathogens from plates ( $p < 0.05$ )

In conclusion, this study showed that SSP slurries significantly cleaned *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 biofilms from stainless steel surfaces. So that, SSP could be used as an alternative disinfectant in food industries.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Biyofilm, mikrobiyel olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak hücre dışı polimerik madde (Extracellular polymeric substances-EPS) içine gömülmüş olan biyolojik bir oluşumdur. Planktonik hücrelerden çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıdadır (Rijnaarts ve ark, 1993; Hood ve Zottola, 1997; Watnick ve Kolter, 2000; Jenkinson ve Lappin- Scott, 2000; Sutherland, 2001; Donlan, 2002). Biyofilm oluşumu dinamik çok aşamalı bir yapılanmadır (Koluman, 2006) ve biyofilm oluşturan bakteriler, çevre koşullarına serbest bulunan planktonik bakterilerden daha dirençlidirler (Kreft ve Wimpenny, 2001). Biyofilm yapısı inhibitörük etkisi olan antibiyotik, dezenfektan ve ısıya karşı koruyucu özellik gösterir. EPS'nin direnci arttırdığı düşüncesi yaygındır, ancak mekanizması açıkça ortaya konulamamıştır (Kreft ve Wimpenny, 2001)

Uzun yıllardan beri biyofilmler çok ilgi görmeye başlamıştır. Çünkü biyofilm mikroorganizmalar açısından bakıldığında doğada tercih edilen bakteriyel bir yaşam tarzı haline gelmiştir. Bakteriler kolayca birçok biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunabilmekte ve biyofilm oluşturabilmektedir. Bunun sonucunda medikal ve endüstriyel gruplarda, biyofilmden kaynaklanan birçok sorun oluşmaktadır (Brooks ve Flints, 2008)

“Çiftlikten masaya gıda güvenliği” prensipleri uygulanırken; elde edilen sağlıklı ham maddenin, gıda işletmelerinde meydana gelen biyofilm bakterileri ile bulaşmasının raf ömrünü kısaltacağı ve bunun yanı sıra içerdiği gıda kaynaklı patojenleri ile büyük halk sağlığı riski oluşturacağı bildirilmiştir (Wong ve Rabotski,1993; Wong, 1994). Bu nedenle gıda işletmelerinde biyofilm problemi ana uğraş kaynağı haline gelmiştir (Dunsmore ve ark., 1981; Chechowski, 1990; Wong ve Rabotski, 1993). Gıdanın, tüketime gelene kadar geçirdiği tüm süreçte; üretim, depolama, gıda işlemeyüzeyleri gibi ana bulaşma kaynakları, kritik kontrol noktaları teşkil ederler. Süt işletmelerinde

en ideal çalışan CIP (Cleaning In Place) sisteminin varlığında bile alet ve ekipman yüzeylerinde mikroorganizma varlığı ortaya konmuştur. Bu mikroorganizmaların kalıntı miktarına, sıcaklığa, bağıl neme bağlı olarak uzun süre üremenin gözlenmediği ancak canlı halde (viable but non culturable) kalabildiği rapor edilmiştir (Dunsmore ve ark., 1981; Chechowski, 1990; Wong ve Rabotski, 1993).

Süt işletmelerinde biyofilm yalnızca süt prosesinde oluşmaz, peynir altı suyunun olduğu ya da işlendiği proseslerde de bulaşma dolayısıyla biyofilm oluşumu rapor edilmiştir (Hup ve ark., 1979; Koutzayiotis; 1992; Flint ve Hartley 1993; Somers ve ark., 1994a). Örneğin, düşük asitlik ve yüksek nem içeriğinden dolayı peynir altı suyundan yapılan lor peynirleri mikrobiyel gelişim için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Samelisa ve ark, 2003). Yapılan bir araştırmada, peynir altı suyu proses ortamlarındaki paslanmaz çelik boruların ultrafiltrasyon membranlarında biyofilm gelişmesi sonucunda, peynir altı suyu tozunda 4 log<sub>10</sub>kob/g bakteri bulunmuştur (Flint ve Hartley, 1993).

Paslanmaz çelik yüzeylerin sıklıkla yer aldığı et işletmelerinde ise biyofilmin işleme ve paketlemede önemli bulaşma yarattığı ve ürünün raf ömrünü azalttığı ortaya konmuştur (Koluman, 2006). Karkas etinden süzülen kanlı suların pH, sıcaklık ve besin yönünden bakteriler için uygun bir üreme ortamı yarattığı (Koluman, 2006) ve karkastan kopabilecek etlerinse lifli yapısından dolayı bakterilerin tutunması için ideal yüzey olduğu kanıtlanmıştır (Schwach ve Zottola, 1982). Ayrıca, paslanmaz çelik ve et suyunun etkileşiminin, yüzey negatif yükünü azaltması ile bakterilerin yüzeye tutunmalarını arttırdığı ortaya konmuştur (Johal, 1988).

Nitekim *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, gibi patojenlerle kontamine gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı bakımından da büyük sorun olduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, bulaşma için çapraz bulaşmanın, personel hijyeninin ve çiftlik hijyeninin önemini ikinci plana iten, üretim alanında yüzeylere yapışan bakterilerin varlığı ortaya konmuştur (Somers ve Wong, 1999; Assanta, 2000; Somers ve Wong, 2001).

Çalıştığımız mikroorganizmalardan biri olan *L. monocytogenes*, sıcaklığa ve yüksek

tuz konsantrasyonuna direnç gösteren, buzdolabı sıcaklığının altında bile hayatta kalabilen, yüzeye kolonize olabilme kabiliyetinde ve ağır gıda enfeksiyonlarına neden olan tehlikeli bir patojendir (Torres ve ark., 2005; Pan ve ark., 2006; Gandhi ve Chikindas, 2007). Araştırmalar *L. monocytogenes*'in sıklıkla süt ve süt ürünlerine bulaştığını göstermektedirler (Helke ve Wong, 1992; Helke ve ark., 1992; Kryszinski ve ark., 1992).

Süt proteinlerinin besleyici etkisi ve süt yağının koruyucu etkilerinin yanı sıra paslanmaz çeliğin yüzeyinde kalabilecek süt hücrelerinin, mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını kolaylaştırması, *L. monocytogenes* biyofilmini önlenemeyen halk sağlığı tehdidi haline getirmiştir (Helke ve Wong, 1992; Helke ve ark., 1992; Kryszinski ve ark., 1992). Süt işletmelerinde bağıl nemin yüksekliği ve sıvı akışının olması nedeniyle *L. monocytogenes*'e ait biyofilm en çok taşıma hattı ve gider kanallarında görülmektedir (Mattila, 1990).

Yapılan çalışmalar et ve et ürünlerinin de *L. monocytogenes*'in bulaşması için uygun ürünler olduğunu göstermiştir (Zivkoviç ve ark., 1992). Et işletmelerinde, üretim yüzeyindeki yağ ve ürün kalıntılarının *L. monocytogenes* biyofilminin oluşumuna katkısı olduğu tespit edilmiştir (Boothe ve ark., 1999; Somers ve Wong, 1999; Somers ve Wong, 2001). Bu kalıntıların biyofilmin oluşumu için gerekli miristik, stearik, oleik ve palmitik asitleri içerdiği görülmüştür. Değişik gıdalarla yapılan bir çalışmada, hem sosisli sandviç hem de etli salataların hazırlandığı yüzeylerden izole edilen *L. monocytogenes* suşları, karma halde paslanmaz çelik ve plastik yüzeylere bırakılıp biyofilm oluşturma güçleri incelenmiştir (Boothe ve ark., 1999; Somers ve Wong, 1999; Somers ve Wong, 2001). Sonuçta yüzey ve ürün çeşidine bağlı bir biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (Boothe ve ark., 1999; Somers ve Wong, 1999; Somers ve Wong, 2001).

Gıda işletmelerinde önemli problemlere yol açan patojenlerden biri olan *S. aureus*'un klinik belirtileri hafif olmakla birlikte en sık görülen gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır (Sudhakar ve ark., 1988; Todd, 1989; Bergdoll, 1991). Zehirlenmelerin başlıca nedenleri, yetersiz hijyen, uygun olmayan sıcaklıkta muhafaza, organizmanın çevresel koşullara dirençli ve yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı toksinler



üretmesidir (Bryan, 1976; Tekinşen ve Keleş, 1994). Özellikle enteropatojenik *S. aureus* suşlarının önemli bir kaynağı olan, meme iltihaplı (mastitisli) hayvanlardan sağılan sütlerle yapılan bir çalışmada, sütte *S. aureus* sayısının  $7 \log_{10}\text{kob/ml}$ 'yi geçebileceği bildirilmiştir (Kınık ve ark., 1998). Mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin, sağlıklı ineklerden elde edilen sütlere karışmış olması, süt ve süt ürünleri için en önemli kontaminasyon kaynağıdır (Küplülü ve ark., 2002).

*S. aureus* insanlarda da vücudun farklı bölgelerinde (ağız, burun, cilt, boğaz-yutak) doğal flora olarak bulunabilmektedir (Unterman, 1972; Ecker ve Lenz, 1990; Kaya ve Metintaş, 1995). İnsanların ellerinden, hapşırma ve öksürme ile burun ve boğaz dokusundan gıda maddelerine ve gıda ile temas eden yüzeylere bulaşma olasılığı yüksektir (Bryan, 1976). *S. aureus* özellikle et ve süt işletmelerinde yüzeyde biyofilm oluşturan bir patojendir (Costerton ve ark., 1978). Süt ve süt ürünleri üretimi yapan bir işletmede yapılan çalışmada, paslanmaz çelikte, *S. aureus*'un biyofilm oluşturma yeteneği araştırılmış ve farklı sıcaklık ve zaman aralıklarında  $9,5 \log_{10}\text{kob/cm}^2$ 'ye varan biyofilm oluşumu gözlemlendiği belirtilmiştir (Oulahal ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada ete bulaşmanın yalnızca etin parçalanması sırasında oluşmadığı, etin ya da et ürünlerinin yüzey ile teması sonucunda da meydana gelebileceği ortaya çıkarılmıştır (Baird-Parker, 2000). Domuz işleme odasında ekipmanlardan % 15 oranında *S. aureus* izole edildiği bildirilmiştir (Pala ve Sevilla, 2004). Sucuk işletmelerinde yapılan bir çalışmada ise karıştırma ve doldurma makinelerinde % 33,33 oranında, kıyma makinesi ve et işleme masalarında % 14,26 oranında *S. aureus* izole edilmiştir (Gounadaki ve ark., 2008).

Biyofilmleri problemlere yol açan patojenlerden biri olan *E. coli* O157:H7 çeşitli yüzeylerde tutunma, kolonize olma ve biyofilm oluşturma kabiliyeti gösterir (Uhlich ve ark., 2008). Bu patojenin en önemli kaynağı, hayvansal gıdalardır. Bu patojenin geçişindeki başlıca gıdalar; sığır eti ve ürünleri ile işlenmemiş çiğ süt ve süt ürünleridir (Cliver, 1990; Chapman ve ark., 1993; Reitsma ve Henning, 1996; Peacock ve ark., 2001).

Et işletmelerinde yapılan bir çalışmada, karkaslarda, paslanmaz çelik yüzeyle buzdolabından çapraz kontaminasyonla bulaşan *E. coli* O157:H7 serotipi tespit edilmiştir (Koluman, 2006). *E. coli* O157:H7'nin paslanmaz çelik yüzeye tutunma davranışını test edilmiş, 4°C'de 24 sa inkübasyon sonrasında,  $5 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  *E. coli* O157:H7 hücrelerinin paslanmaz çelik yüzeye yapışmış olduğu saptanmıştır (Ryu ve ark., 2004). *E. coli* O157:H7'nin 4°C'de iyi tutunması beklenmezken, hücreler soğuktan zarar gördüğü ve stres altında oldukları için sağlam hücrelere göre daha dirençli ve daha iyi tutunabilmektedirler (Frank, 2000).

Biyofilm temizlenmesinde sıklıkla kuarterner amonyum bileşikleri (KAB), klorlu ve iyotlu bileşikler ve asitler kullanılır (Sharma ve Anand, 2002). Et işletmelerinde yapılan bir çalışmada, *E. coli* ve *S. aureus* ile kontamine edilen paslanmaz çelik yüzeylerde sodyum hipoklorit ve perasetik asitin etkinlikleri incelenmiş ve sodyum hipokloritin analiz edilen bakteriler üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda perasetik asit araştırmacılar tarafından et işletmelerinde dezenfeksiyon ajanı olarak önerilmemiştir (Rossoni ve Gaylard, 2000). Ancak daha etkili olduğu ortaya çıkan sodyum hipoklorit, klorlu bir bileşik olduğu için paslanmaz çelik yüzeylerde korozyona neden olmaktadır (Karagözlü ve Karagözlü, 2004).

Dezenfektan kullanımında bir diğer sorun bazı patojenlerin zamanla dezenfektanlara karşı direnç geliştirmeleridir. Örneğin, süt işletmelerinde yapılan bir çalışmada *Listeria* türlerinin meydana getirdiği biyofilm tabakasının hipoklorit aside dirençli olduğu belirtilmiştir. Hipoklorit asitin, *Listeria* türlerine karşı, bakterinin hücre duvarı yapısını bozması ve etkili bir glikoprotein parçalayıcısı olması nedeniyle, KAB ve iyodoforlardan daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak *Listeria* türleri KAB ve halojenlere karşı direnç kazanmıştır (Hood ve Zottola, 1995). Yapılan diğer bir çalışmada, KAB'ne karşı dirençli olan *Staphylococcus spp.*'nin % 13'ünün benzalkonium kloride karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu direnç gelişiminin *Staphylococcus spp.* plazmidlerinde taşıdığı qac (qacA, qacB, qacC, qacD, qacH) genlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Fitzgerald ve ark., 1993).

Biyofilm temizliğinde kullanılan dezenfektanların bir çoğu yetersiz drenaj koşulları,

son durulamanın yetersiz yapılması ve deterjan, dezenfektan kalıntılarının ekipman yüzeylerine absorpsiyonu nedeniyle kalıntı bırakırlar (Karagözlü ve Karagözlü, 2004). Örneğin, KAB gözenekli ve gözenekli olmayan yüzeyler tarafından absorbe edilmekte ve dikkatsiz ve özensiz yapılan durulama önemli miktarlarda KAB bileşiklerinin gıdaya geçmesine neden olabilmektedir. Nitekim KAB bileşiklerinin kullanımından kaynaklanan 0.69 mg/l düzeyinde kalıntının gıdalarda bulunduğu saptanmıştır (Dunsmore ve ark., 1978).

Sağım makinalarının iyodoforlar ile muamelesi neticesinde ise gözenekli yüzeyler tarafından iyodofor bileşenlerinin absorpsiyonu sütteki dezenfektan kaynaklı bulaşmanın kaynağını oluşturmuştur. Söz konusu bu bulaşma sütteki iyot konsantrasyonunu 20-50 µg/l arttırmaktadır (Francke ve ark., 1983; Hemling, 2004). Araştırmalarda bulunan dezenfektan madde kalıntılarının miktarları genellikle 2 ppm'den daha azdır (Karagözlü ve Karagözlü, 2004). Bu düzey toksik ya da öldürücü doz olarak belirtilen 0.5–3.0 g/l'nin oldukça altında bulunmaktadır ancak söz konusu bu maddeleri düşük seviyelerde içeren süt ve et gibi hayvansal orijinli gıdaların tüketiminin uzun dönemde etkisinin ne olacağı tam olarak bilinmemektedir (Karagözlü ve Karagözlü, 2004). Tirotoksikosis oluşumuna iyodürün etkisine ait bazı bilgiler mevcuttur. Japonya'da yapılan bir araştırmada hidrojen peroksitin farelerin on iki parmak bağırsağında kansere sebep olabildiği saptanmıştır (Toyoda ve ark., 1982).

Yukarıdaki çalışmalar biofilm temizliği için sıklıkla kullanılan kimyasalların çoğuna *L. monocytogenes*, *S. aureus*, ve *E. coli* O157:H7 patojenlerin ya direnç sağladığını ya da kullanılan kimyasalların paslanmaz çelik yüzeylerde korozyona neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca eksik durulama nedeniyle oluşabilecek kimyasal kalıntıların uzun dönemde insan sağlığını nasıl etkileyeceği de bilinmemektedir. Bu nedenlerle, doğal olduğu için insan sağlığına herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı kanıtlanan midye kabuğu tozunun paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm temizliği için alternatif bir dezenfektan olabileceği düşünülmüştür. Midye kabuğu tozu, kalsiyum oksitten oluşmuştur. Bu ürün doğal bir yapıya sahip olup bu çalışmada test edilen *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7'nin üremesine karşı durdurucu etkisi bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sawai, ve ark.,

2001a,b; Bae ve ark., 2006;Yaldırak ve Çağrı-Mehmetoğlu, 2009; Bodur ve ark., 2010).

Bu çalışmada, paslanmaz çelikten yapılmış metal yüzeyinde, et tezgahı yıkama suyu ve peyniraltı suyunda gelişen *L. monocytogenes*, *S. aureus* veya *E. coli* O157:H7, tarafından oluşturulan biyofilmlerin temizliğinde % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarda midye kabuğu tozu ozeltisinin 1, 5 veya 10 dakika süre ile etkisi araştırılmıştır.

## **BÖLÜM 2. KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1. Biyofilm**

#### **2.1.1. Biyofilmin tanımı**

Islak yüzeylerde gelişen mukoid yapılardaki bakterilerin fenotipik olarak planktonik hallerinden farklı oldukları bildirilmiştir. Bu farklılıktan yola çıkarak, bu mukoid yapılara, İngilizce canlı tabakalar anlamına gelen “BİYOFİLM” isimlendirmesi uygun görülmüştür (Brock, 2003)

Diğer bir ifadeyle, mikrobiyel hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit yapı ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskopik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 mm yükseklikte, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir. Matriks içinde kan pıhtısı, kristaller, toprak, metal korozyon artıkları bulunabilir bu nedenle biyofilmin rengi bulunduğu yere göre değişir. Bakteriler değişik yüzeylere tutunabilirler; bu yüzeyler arasında canlı dokular, burun, ağız gibi doğal delikler, vücut içi uygulanan medikal cihazlar, endüstriyel ve içilebilir su sistemleri, doğal su sistemleri yer alır (Donlan, 2002).

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla:

1. EPS çevreden besin maddelerini (C - N - PO<sub>4</sub> gibi) konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.
2. Biyofilm oluşturan bakteriler antimikrobiyel maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik

geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.

3. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanısıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobeyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.
4. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler.

### **2.1.2. Biyofilm yapısı ve genel özellikleri**

Olgun bir biyofilmin kütesinin %75–90'ını EPS oluşturmaktadır (Allison, 2003) ve EPS' nin büyük bir kısmını su oluşturur (Shutherland, 2001). Matriks içindeki diğer bileşenler ise; globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir (Padera, 2006) .

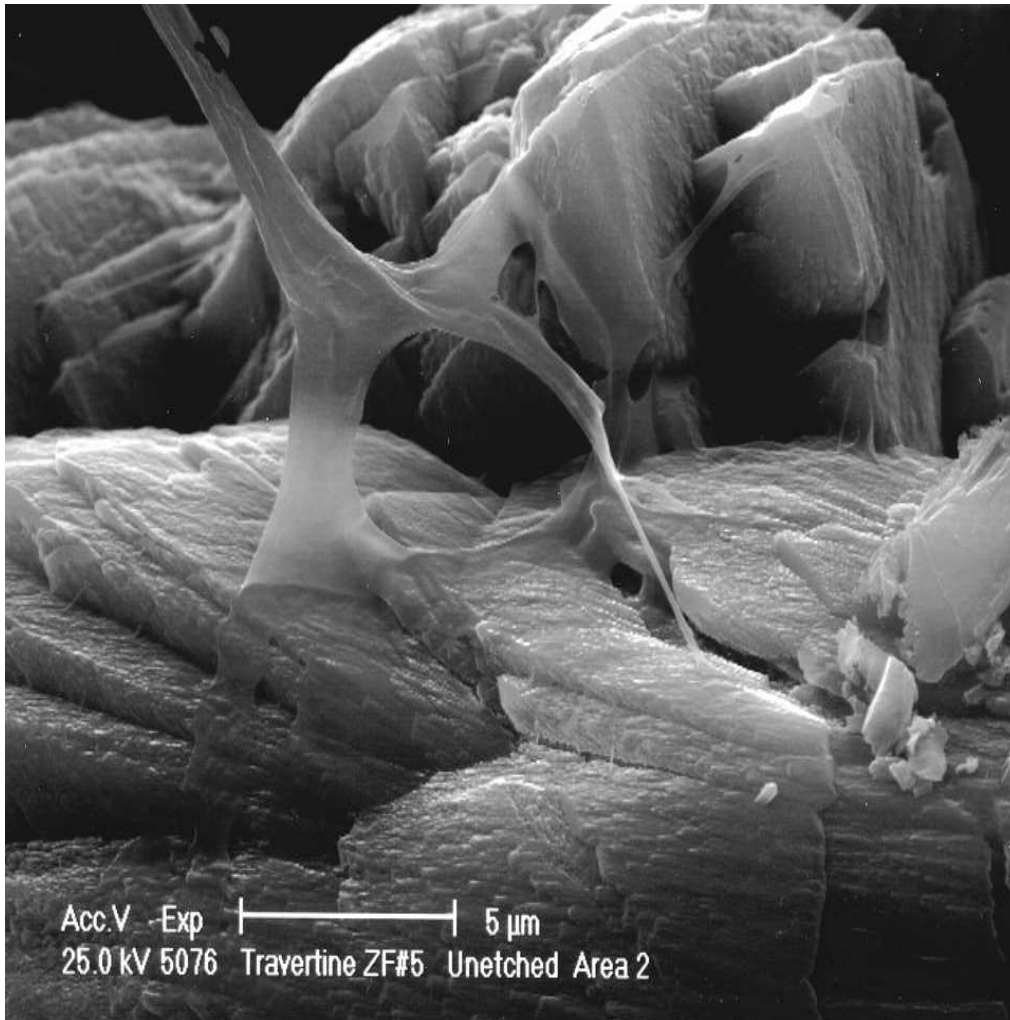
#### **2.1.2.1. Hücre dışı polimerik maddeler (EPS)**

EPS formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Sutherland, 1998; Ramesh ve Tharanathan, 2003). Bu ürün bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eder ve besleyiciler ile konuşlanmış sert yüzeylere tutunmalarını sağlar (Costerton ve ark., 1987; Kumar ve Anand, 1998). EPS'ler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar ya da yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunurlar (Şekil 2.1a ve 1b). Jel formasyonu flokulasyon, emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pekçok role sahip bu polimerler biyolojik aktif biyofilm, matriksinin yapı materyalidir (Yalpani ve Sandford, 1987).

Biyofilmin mikrobiyel hücreler ve EPS ana iskeletinden oluştuğu, EPS'nin toplam organik karbonun % 50 – 90'nını barındırarak ana maddeyi (matriks) oluşturduğu kabul edilmiştir. EPS'nin kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik gösterse de öncelikli olarak polisakkaritten oluştuğu, polisakkaritlerden bir kısmının doğal, bir

kısının da anyonik yapıda olduğu ortaya konmuştur. Uronik asitlerin (D-glucuronik, D-galacturonik ve mannuronik asitler) ya da piruvatların bu yapıya anyonik özellik kattığı bildirilmiştir (Sutherland, 2001). Biyofilmde Gram pozitif bakterilerin varlığında EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur (Hussain ve ark, 1993).

Sutherland (2001) tarafından yapılan bir çalışmada EPS'nin yüksek seviyede su içerdiği ve yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar barındırdığı bildirilmiştir. Leriche ve ark. (2000) tarafından yapılan paralel bir çalışmada ise hidrofilik bölümlerde yapının % 93'ünün su olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.1a: EPS yapısı (Sutherland,2001)



Şekil 2.1b: EPS içinde basiller (Sutherland,2001)

### 2.1.2.2. EPS' nin Genel Özellikleri

EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleyle sahiptir. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Kenne ve Lindberg, 1983; Calazans ve ark., 1997; Gugliandola ve ark., 2003).

Bakteriyel EPS'ler genellikle immunojeniktirler. İn vitro çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Gugliandola ve ark., 2003).



Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Sutherland, 1990; Costerton ve ark., 1994). EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (Calazans ve ark., 1997).

EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre yapılarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarılardan EPS üretimi etkilenmektedir (Shankar ve ark., 1995).

### **2.1.2.3. EPS biyosentezi**

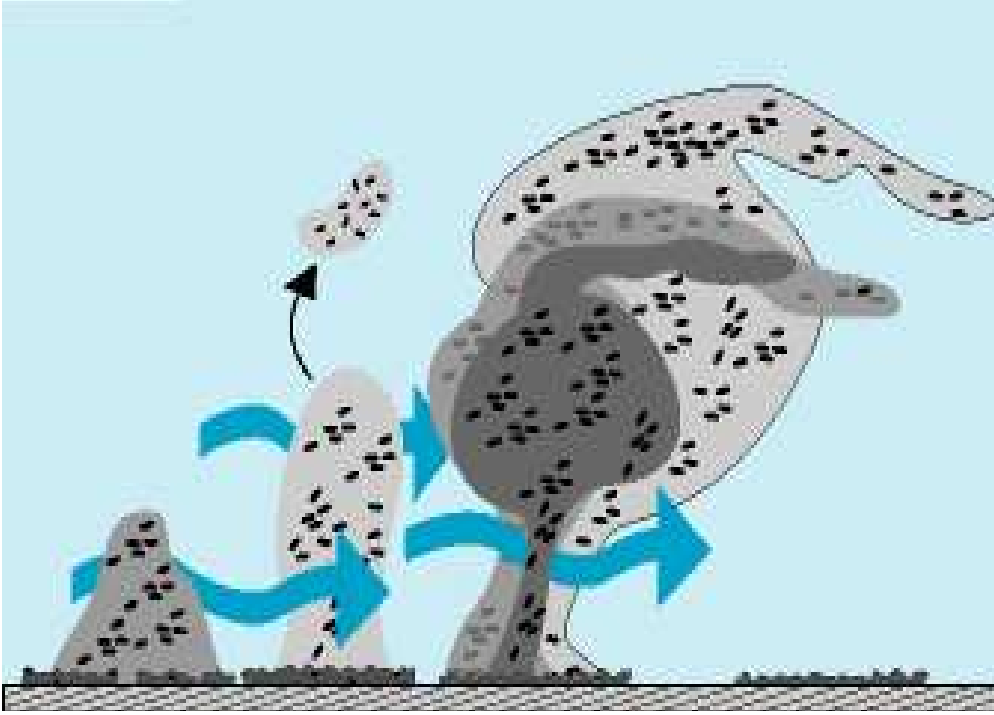
EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS'lerin oluşumunda, UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil – transferaz 1 ve 2, ve polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır (Sutherland, 1977).

Heteropolisakkaridler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaridlerin sentezi farklıdır. Örneğin, nötral levan ve dekstran homopolisakkarid'in sentezi birbirinden farklıdır. Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sukroz varlığında sırasıyla, levansukraz ve dekstransukraz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedirler (Sutherland, 1990).

Sutherland (1977), üretilen polimerin molekül ağırlığının, bakterinin çoğalma miktarının fonksiyonu olarak değiştiğini bildirmiştir. EPS üretiminde bulunan yapısal genlerin keşfi, EPS üretiminin plasmid yeri için delil sağlamıştır (Van Kranenburg ve ark., 1997; Van Kranenburg ve ark., 1999). Bunun tersine termofilik yoğurt bakterileri için, EPS üretiminin kromozomlar tarafından kodlandığı bulunmuştur (Stingele ve ark., 1996; Lamothe, 2000).

### 2.1.3. Biyofilm yapısı

Biyofilmin üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapı (Şekil 2.2) olduğu bildirilmiştir (Sutherland, 2001).



Şekil 2.2. Biyofilm mimarisine örnek (Koluman, 2006)

Tabakalı yapının alttaki hücreleri stabilize ettiği, biyofilmde antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımı açısından değişkenlik gösteren tabakalar oluştuğu vurgulanmıştır (Leriche ve ark., 2000; Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000).

Biyofilmde fiziksel ve biyolojik yapının içsel ve dışsal faktörlerin etkileşimi ile düzenlendiği, fiziksel yapının EPS ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. EPS'nin jel ya da viskoelastik davranış sergileyebileceği, bu fazlara geçişinde protein,  $Ca^{+2}$  iyonları, polisakkaritler ile yapının sağlamlaştığı bildirilmiştir (Hussain ve ark., 1993; Leriche ve ark., 2000; Sutherland,2001). Bakteriyel tutunmada proteinlerin, organik moleküllerin yüzeye tutunmasında önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm yapısı içinde düzenli bir şekilde oluşur (Lasa ve Penadés, 2006). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyofilm Birleşmiş

Protein Yapısı (BAP-Biofilm associated protein), organizmanın yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından da önemlidir (Tormo ve ark., 2005). Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilmektedir (Allison, 2003). Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilmde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir.

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür (Poulsen, 1999). Heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranı, farklı türlerin sayı ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm kalınlığı laminer ve türbülant akış arasında maksimum seviyededir. Laminer alandaki kalınlık substrata ulaşabilirliğine, türbülant akışta ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir (Poulsen, 1999). Biyofilmler yoğun yüzeyler olarak bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda, su ve besin maddesinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapısının olduğu belirlenmiştir (Costerton ve ark., 1995). Biyofilm yapısındaki su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır. Hücresel atık biyofilmin yüzeyinde kanallarla gizlenir. Taşıma işlemi, su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaştırılır. Kolaylaştırılmış taşıma biyofilm içerisine molekül taşınmasına yardımcı olur. Ayrıca su kanallarının, içteki alanlara oksijen taşıdığı da belirlenmiştir (Costerton ve ark., 1995).

Konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküllerin biyofilm mimarisine katıldığı bazı çalışmalar da rapor edilmiştir (Costerton ve ark., 1999). Canlı sistemlerde zaman içerisinde eritrosit ve fibrin katılımı ile besince daha zengin ve daha stabil bir biyofilm oluşumu görülmüştür. Su sistemlerindeki biyofilm ise paslanmaz çelik borulardaki demiri indirgeyerek korozyona neden oldukları ve borularda yeni tutunma yüzeyleri oluşturdukları ortaya konmuştur (Costerton ve ark., 1999; Koluman, 2006).

#### **2.1.4. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler**

Douglas (2003), bakteriyel biyofilm oluşumunu etkileyen faktörleri iç ve dış faktörler olarak iki gruba ayırmıştır. İç faktörler; su aktivitesi (aw), besin maddelerinden faydalanma durumu, antimikrobiyel madde içeriği, pH değeri ve asidite, oksijen değişkeni ve elektriksel değişkenlik olarak sıralanırken dış faktörler; yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı ve sınırlı besin maddesi olarak belirlenmiştir. Ek olarak, hücre yüzeyinin biyokimyasal yapısının da tutunmada etkili olduğu ortaya konmuştur (Fletcher ve ark., 1991; Williams ve Fletcher, 1996; Koluman, 2006). Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, EPS üretimi, fimbria ve flagella varlığının da tutunmayı etkileyen faktörlerden olduğu bildirilmiştir. Hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı, tutunma yüzeyinin hidrofobik ve non-polar özelliği ile bir etkileşim göstermesiyle tutunmanın sağlandığı ortaya konmuştur (Bullitt ve Makowski, 1995).

#### **2.1.5. Biyofilm oluşum mekanizması**

Biyofilm oluşumu genelde zaman gerektiren bir süreçtir (Şen ve ark., 2008). Ancak ortama ve bakterinin kendisine bağlı olarak, gıda işleme alanlarında biyofilm oluşumu göreceli olarak daha kısa sürelerde gerçekleşmektedir (Mafu ve ark., 1990). Aynı zamanda bakteri hücre duvarının yapısına göre de (yüzey yükü, hidrofilitesi, yüzey enerjisi ve organeller) yüzeyde biyofilm oluşumu hızlanabilmektedir (Dewez ve ark., 1998).

Bakterilerin yüzeye tutunması, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki basamakta incelenebilir (Lindsay ve Von Holy, 2006a).

##### **2.1.5.1. Dönüşümlü tutunma**

Dönüşümlü basamakta, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (Costerton ve ark., 1995; Poulsen, 1999).

Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür (Costerton ve ark., 1995). Hücreler bu fazda, Brownian hareket (hücresinin olduğu yerde titreme hareketi) gösterirler (Marshall ve ark., 1971) ve durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler (Lindsay ve Von Holy, 2006).

### 2.1.5.2. Dönüşümsüz tutunma

Dönüşümsüz tutunmada ise yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır (Poulsen, 1999). Ayrıca, polimerik fibriller bakteriyel hücre ve alt katman arasında bir köprü oluşturur ve bu yüzey ile dönüşümsüz bir birleşime olanak tanır (Marshall ve ark., 1971). Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleriyle ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (Poulsen, 1999). Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar öncelikle organik materyale dönüşümlü olarak, sonra da flagella ve fimbriaları ile dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir.

Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir. Dönüşümsüz basamakta, hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir (Poulsen, 1999). Gıda endüstrisinde en yaygın olarak *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleri biyofilm oluşturmaktadır (Poulsen, 1999). Kırmızı et ve et ile temastaki yüzeylerde biyofilm oluşturan bakteriler, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.* olarak sayılabilir (Poulsen, 1999). Süt ve süt ürünleri ve proses yüzeylerinde ise *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Listeria spp.* ve laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmalar biyofilm oluşturmaktadır (Chmielewski ve Frank, 2003).

### **2.1.5.3. Öncü bakterinin tutunması ve mikrokoloni oluşumu**

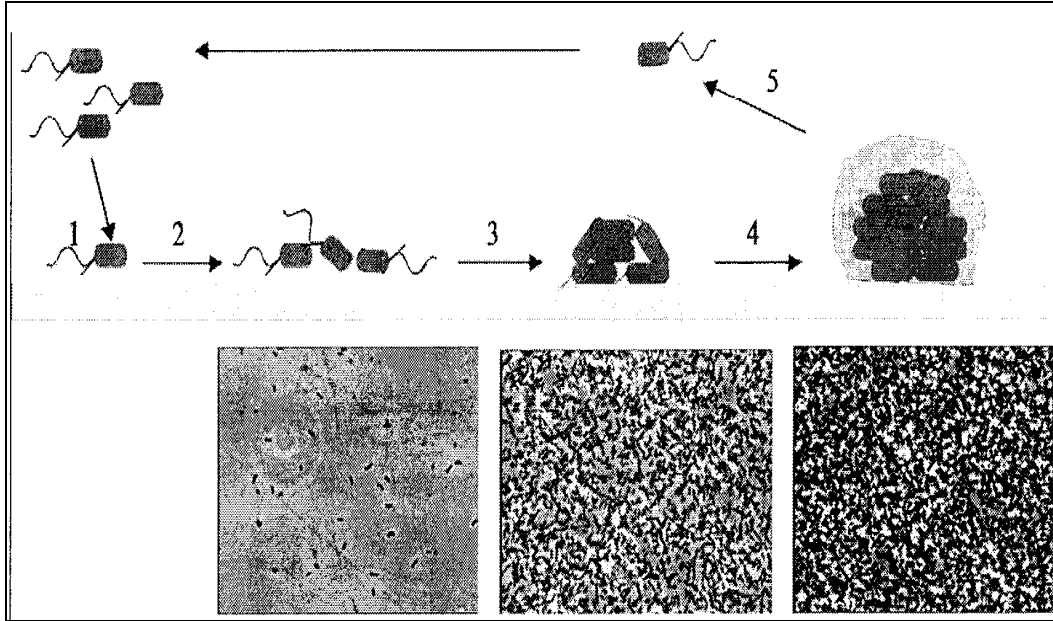
Biyofilm oluşumunun son aşaması yüzey kolonizasyonudur (Poulsen, 1999). Tutunan bakteri gelişir ve daha sonra bölünür. EPS de, diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen, 1999).

### **2.1.5.4. Biyofilm oluşumu**

Bu evrede, mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (Poulsen, 1999). Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekzopolisakkarid ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Kumar ve Anand, 1998; Poulsen, 1999). Biyofilm, farklı besin gereksinimleri olan farklı mikroorganizmaların kolonizasyonu ile, heterojen olabilir, yüzeyde tek düze dağılması gerekmez. Biyofilm hacmi, artıkların olması ya da biyofilmi çevreleyen sıvı fazdan, biyofilme küçük partiküllü cisimler ve organik ve inorganik maddelerin yapışması ile gerçekleşir (Melo ve ark., 1992).

### **2.1.5.5. Kopma ve ayrılma**

Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır (Poulsen, 1999). Bu ayrılma işlemi sıvı dinamiği, kütle sıvısının kayma etkisi ile olabileceği gibi (Rittmann, 1989; Applegate ve Bryers, 1991) kimyasalların varlığı ve bakteri ve alt tabakanın değişmesiyle de olabilir. Serbest kalan hücre yeni bir yüzeye gider ve biyofilm oluşumu bu yüzeyde tekrarlanır (Marshall, 1992).



a. Geri Dönüşümsüz Tutunma b. Mikrokoloni Oluşumu c. Olgun Biyofilm

Şekil 2.3. Biyofilm Gelişimi (Pearson ve Karatan, 2005)

### 2.1.6. Gen transferi

Bakterilerin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerin çok çeşitli olduğu, bunların hücrenin bulunduğu ortam, diğer hücrelerle etkileşimleri ve kendi içlerindeki değişimlere bağlı olarak, geniş bir perspektif sergiledikleri bildirilmiştir (Davison, 1999).

Biyofilmin ekstrasözomal DNA (plazmid) değişimi için ideal yapı olduğu ortaya konmuştur. Konjugasyonun biyofilm hücrelerinde, planktonik yapıdakilerden daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Ehlers ve Bouwer, 1999; Hausner ve Wuertz, 1999). Ghigo (2001), konjugasyona hazır plazmid içeren bakterilerin biyofilm oluşturmaya yatkın olduğunu öne sürmüştür. *E. coli*'ye ait F plazmidinin aktif olarak sentezlediği, F konjugatif pilusunun hem hücre yüzeyi hem de hücre ile başka bir hücre arasında yapışma faktörü olduğu ortaya konmuştur. Verici hücrelerden, alıcı hücrelere aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabileceği bildirilmiş ve buna bağlı olarak, biyofilmin

antibakteriyellere karşı gelişen direncin yayılmasında önemli rol oynayabileceği iddia edilmiştir (Koluman, 2006).

### 2.1.7. Mikrobiyel populasyon etkileşimi (quorum sensing)

Arnold ve Silvers (2000)' e göre, mikrobiyel populasyon etkileşimi (MPE) ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama 'Ben buradayım' mesajı veren bir molekül salgılar. Yüze-ye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler ekstrasellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (Arnold ve Silvers, 2000). Biyofilm oluşumunun genetik analizi sonucu ekstrasellüler sinyaller ve MPE düzenleme sistemlerinin biyofilmin varlığı için önemli olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, uyarılmış biyofilmin tutunma yüzeyinden sürfektanlar ile kolayca yerinden söküldüğü bildirilmiş bunu takiben mikrokolonilerin olduğu ortama homoserine lactone eklendiğinde, normal yükseklikte biyofilm oluştuğu bildirilmiştir (Kjelleberg ve Molin, 2002). Davies ve ark. (1998) ise *P. aeruginosa*'ya ait biyofilm oluşumu ile ilgili genlerden *lasR-lasI* ve *rhlR-rhII* uyarım sistemlerini göstermişlerdir. Bu genlerden herhangi birinin uyarımı sonucu, yeterli sayıda biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerinin önce mikrokoloniler oluşturduğu, daha sonra ince bir biyofilm tabakası meydana getirdikleri bildirilmiştir.

MPE iki şekilde gerçekleşir; türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim (Raffa ve ark., 2005). Gram negatif bakterilerde türden türe MPE mekanizmasında oto-endükleyici olarak N-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptidler (autoinducering peptitler) (Wong, 1998), hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler ortak olarak oto-endükleyici -2 (AI-2's) kullanmaktadır (Raffa ve ark., 2005). AHL-temelli MPE sisteminin hem biyofilm oluşumunu hem de bakterilerin iletişimini sağladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, AHL'in diğer MPE ajanlarından farklı olarak, kolonizasyondan da sorumlu olduğu ortaya konmuştur (Kjelleberg ve Molin, 2002).



Son yıllarda yapılan çalışmalarda *E. coli* ve *S. enterica*'nın hücreden hücreye etkileşiminin AI-2 sinyalleriyle gerçekleştiği belirlenmiştir (Ahmer, 2004). Bu sinyal moleküllerinin üstel gelişim süresince üretildiği ve bakteri membranına serbestçe geçebildiği ifade edilmektedir. Bir başka deneysel çalışmada ise, *S. aureus*'un MPE mekanizması bloke edildiği zaman biyofilm oluşumunun arttığı gözlenmiştir (Donabedian, 2003). Bunun sonucunda *S. aureus*' un düşük miktarlarda biyofilm oluşumunu artırırken, yüksek miktarda bulunduğu ortamda biyofilm oluşumunu bırakarak konuk hücreyi işgal ettiği düşünülmektedir.

### 2.1.8. Biyofilmde antimikrobiyel direnç

Biyofilm oluşturan bakterilerin planktonik hallerine göre çeşitli antimikrobiyellere, antiseptik ve iodin, iodinpolivinil-pirollidon kompleksi, klorin, monokloramin, peroksijenler ve glutraldehit gibi biositlere 10-1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Douglas, 2003; Cloete, 2003) Bu durum, bu zehirli maddelerin biyofilm yapısından difüzlenmeleri nedeniyle film yapısında hiçbir zaman gerekli derişimlere ulaşamamalarından kaynaklanmaktadır (Anwar ve ark., 1992). Bununla beraber film yapıya gömülü olarak yaşayan bakteriler serbest olarak bulunan bakterilere göre daha az oksijen ve besin almaktadır (Anwar ve ark., 1992). Bu durumdaki bakterilerin çoğalma hızı oldukça yavaşlamakta, bu nedenle zehirli kimyasallara karşı olan direncin arttığı düşünülmektedir (Bower ve ark., 1996).

Biyofilmde direnç için; bakteriler arası konjugasyon, plazmid, EPS varlığı ve MPE çeşitli bakterilerin katılımı ile oluşan bir popülasyonda bazı mikroorganizmaların yüzeye yerleşerek kalkan görevi görmesi gerektiği bildirilmiştir (Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001). Örneğin, bazı antimikrobiyeller oksijenli ortamda daha etkindir. Bu tür antimikrobiyelin etkisinin biyofilmin anaerob ve mikroaerofilik alanlarında azalacağı, üst tabakalarda bulunan bakterilerinse antimikrobiyelden etkilenseler bile dirençlerini koruyacakları ortaya konmuştur (Mah ve O'Toole, 2001).

Biyofilm organizmalarını yok etmek veya ortadan kaldırmak için, biosit EPS'e nüfuz etmelidir ve mikrobiyel hücreye geçişi sağlanmalıdır (Meyer, 2003). EPS'nin

kimyasal bileşimi biyofilm çeşitlerine göre değiştiğinden, biyofilm çeşidine özel dezenfeksiyonlar tercih edilmemektedir (Jang ve ark., 2006). Bir biyofilm içindeki bakteri sayısını azaltmak için 1000 ppm den fazla aktif klorin konsantrasyonu gerekli iken, planktonik hücreler için 10 ppm yeterli olmaktadır. Biyofilmle mücadelede aktif klorin öncelikle tercih edilmesinin sebebi, mikroorganizmaları öldürmesinin yanı sıra, yüzeyden EPS'in de uzaklaştırılmasını sağlamasıdır (Meyer, 2003). Çünkü EPS mikrobiyal gelişimi engelleyen katyonları, toksik metal iyonları ve biyofilm ile temas eden kimyasal maddeleri bağlar ve böylece mikroorganizmaların klorin gibi dezenfektanlara karşı dirençleri artmış olur (Şener ve Temiz, 2004). Örneğin, *Vibrio cholerae* tarafından üretilen EPS (amorphous exopolysaccharide) nedeniyle klora karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Stewart ve ark., 2000; Nel ve ark., 2002). Benzer bir çalışmada ise süt işletmelerinde, paslanmaz çelik borulardan geçen 4°C'deki sütte *Listeria spp.*'nin 20 dakikada yüzeye tutunabildiği ve *Listeria* türlerinin meydana getirdiği biyofilm tabakasının hipoklorit aside dirençli olduğu bildirilmiştir. (Hood ve Zottola, 1995). Ayrıca, *L. monocytogenes*'in dezenfektanlara karşı dayanıklılığını yapışma yüzeyinin etkilediği bildirilmiştir (Dunsmore ve ark., 1978; Carpenter ve Erf, 1993). Yapılan çalışmalarda, *L. monocytogenes*'te olduğu gibi mikroorganizmaların hidrofobik materyallere (plastik ve kauçuk gibi) hidrofilik materyallerden (paslanmaz çelik ve cam gibi) daha yüksek düzeyde bağlandığı belirtilmektedir. Bakteriyel tutunma ve biyofilm oluşum düzeyinin en az olduğu materyal olarak paslanmaz çelik gösterilmekte ve bu nedenle gıda işletmelerinde gıda ile temas eden yüzeylerde bu materyalin (özellikle AISI 304 tipi) kullanımı önerilmektedir (Arnold ve Silvers, 2000).

Bakterilerin antibiyotik direncinin bilinen mekanizmaları; dışarı atım pompaları (efflux pumps), enzim modifikasyonları ve belli hedeflerin mutasyonları (target mutations) olarak bilinir (Komlos ve ark., 1999). Ancak bu mekanizmaların biyofilm bakterilerinde işe yaramadığı ortaya konmuştur (Teale, 2002). *Klebsiella pneumoniae*'ya ait  $\beta$ -laktamaz negatif süşun planktonik halinin 2 mg/ml ampisilin bulunan sıvı ortamda inhibe olduğu, aynı planktonik bakterinin biyofilm geliştirdikten sonra inhibisyonu için 5000 mg/ml ampisilin gerektiği ve bu miktarın planktonik hücrelerin yaklaşık % 66'sının inhibisyonuna yeterli olduğu bildirilmiştir (Komlos ve ark., 1999; Teale, 2002).

## 2.2. Biyofilm Kaynaklı Problemler

Mikrobiyel biyofilmlerin; aletlerin üzerinde oluşturdıkları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıkları milyonlarca dolarlık kayıpların oluşmasına neden olmaktadır (Fujishige ve ark., 2006). Gıda ile temas eden yüzeylerde meydana gelen biyofilm sağlık açısından da çeşitli problemler yaratmaktadır. Biyofilm yapısında bulunma ihtimali olan patojen mikroorganizmalar sağlık açısından, diğer mikroorganizmalar ise gıdanın bozulması açısından risk oluşturmaktadır (Millsap ve ark., 1998).

### 2.2.1. Patojenlerin oluşturduğu biyofilmler

Gıda üreticileri açısından problem oluşturan patojenler biyofilm şeklinde sadece işletme ortamındaki ekipman yüzeylerinde değil aynı zamanda üretilen gıda ürününün yüzeyinde de oluşabilmektedir (Brooks ve Flints, 2008). Ürünler arasında çapraz bulaşma ve işlem sonrası ürünlerdeki bulaşmaya sebebiyet verebilmektedir.

Süt işletmelerinde en ideal çalışan CIP (Cleaning In Place) sisteminin varlığında bile alet ve ekipman yüzeylerinde mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir (Koluman, 2006). Bu mikroorganizmaların kalıntı miktarına, sıcaklığa, bağlı neme bağlı olarak uzun süre kültüre edilemediği ancak canlı halde (viable but non culturable) kalabildiği bildirilmiştir (Dunsmore ve ark., 1981; Chechowski, 1990; Wong ve Rabotski, 1993). Süt işletmelerinde boruların bağlantısı için kullanılan plastik contaların biyofilm oluşumuna etkisini araştıran Chechowski (1990), contaların kullanım süresine bağlı olarak izole edilen bakteri sayısının arttığını, bitişi olmayan borular, ek yerleri ve vanaların olduğu noktalarda türbülansın azalmasıyla sütün durgunlaşmasına bağlı olarak biyofilm oluşumunun hızlandığını bildirmiştir. Aynı çalışmada ekipman yüzeyinin zamanla aşınmasının ve oluşan çatlak ve çiziklerin bakteri birikimi için uygun bir ortam oluşturdıkları saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar bakterilerin süt işleme sırasında bile borular içerisinde kısa sürede tutunarak biyofilm oluşturduğunu göstermiştir (Frank ve Koffi, 1990; Helke ve ark., 1992). Örneğin, süt işletmelerinde, sağım hattında soğutmaya gönderilen sütün

geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan akan 25°C' deki sütte *Pseudomonas aeruginosa*'nın 30 dak içerisinde borulara tutunabildiği, soğumadan işlemeye gönderilen süttün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan geçen 4°C'deki sütte ise 2 saat içinde borulara tutunabildiği bildirilmiştir (Helke ve ark., 1992). *Listeria spp.*' nin ise 4°C'de 20 dakika gibi kısa bir sürede yüzeye kolaylıkla tutunabildiği görülmüştür (Frank ve Koffi, 1990).

Yine biyofilmin, et işletmelerinde işleme ve paketlemede önemli kontaminasyonlara neden olduğu, ürünün raf ömrünü azalttığı ortaya konmuştur (Koluman, 2006). Yapılan bir çalışmada, kesimden hemen sonra karkasların mikroflorası incelenerek, üretim zincirinde her aşamada örneklenmiş ve ette buzdolabı yüzeyinden ve paketleme bölümünden bulaşan, biyofilm bünyesinde bulunan *E. coli spp.* gibi tehlikeli gıda patojenleri izole edilmiştir (Koluman, 2006). Pala ve Sevilla (2004), domuz işlenmesinden 4 saat sonrasında bile domuz etinin işleme odasındaki ekipmanlardan % 15 oranında *S. aureus* izole edildiğini bildirmişlerdir. Değişik gıdalarla yapılan bir diğer çalışmada, hem sosisli sandwich hem de etli salataların hazırlandığı yüzeylerden izole edilen *L. monocytogenes* suşları, karma halde paslanmaz çelik ve plastik yüzeylere bırakılıp biyofilm oluşturma güçleri incelenmiştir. Sonuçta üretim yüzeyindeki yağ ve ürün kalıntılarının biyofilm oluşumunu zamanla arttırdığı ve plastik yüzeylerde paslanmaz çelik yüzeylere göre daha iyi bir tutunma olduğu bildirilmiştir (Somers ve Wong, 2004).

Genel olarak, biyofilm oluşumu hijyen ve sanitasyon problemleri doğurmakta ve sonucunda üründe bozulma ve patojen mikroorganizma gelişmesiyle sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Ayrıca yüzeyde yerleşmiş olan mikroorganizmalar, yüzey korozyonuna da sebep olmaktadır (LeChavier ve ark., 1988; Costerton ve ark., 1994).

### **2.2.2. Biyofilimde bakteriyofaj**

Bakteriyofajlar starter kültürün verimli bir şekilde çalışmasını engellediği için peynir endüstrisi için önemli tehditlerden bir tanesidir (Ölmez, 2009). Biyofilm oluşumu bakteriyofaj kaynağı oluşturma tehlikesinden dolayı peynir üretimi yapılan

işletmelerde önem kazanmıştır. Starter organizmaların bulunabileceği peynir altı suyu ve atık su iletimindeki boru hattı, işletme boru hatları, yüzey kanalları ve tanklar gibi alanlar biyofilmlerin gelişimi için çok uygundur (Ölmez, 2009). Burada oluşan biyofilmlerin de fajların oluşmasında teşvik edici olduğu düşünülmektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada peynir starter organizmalarının paslanmaz çelik yüzeyinde  $6 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  ye ulaşabilen yoğunlukta biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir (Ölmez, 2009). Biyofilm hücrelerindeki fajların etkisiyle meydana gelen ilk azalma, 6 saat sonra meydana gelmiş ve bu noktada hücrelerle faj arasında bir denge kurulduğu kanıtlanmıştır.

Resch ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada *S. aureus* hücrelerinin biyofilm ve planktonik hücre içinde kendiliğinden ortamda faj oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Oluşan bu fajlar biyofilmdeki hücrelerin bir kısmının lizisine neden olmuştur (Brooks ve Flints, 2008). Hayatta kalan hücreler, lizize uğramış komşu hücrelerden kendilerine besin kaynağı oluşturmaktadır. Gıda işletmelerindeki ekipmanlarda gerçekleşen bu tür etkileşimler ve fajların önemi halen araştırılmaktadır.

### 2.2.3. Biyofilm kaynaklı endüstriyel kayıplar

Gıda endüstrisi açısından mikroorganizmaların gıda işleme prosesi sürecinde makina ve ekipmanlar üzerine tutunup burada biyofilm oluşturması sağlık açısından olduğu gibi endüstriyel alanda işletme maliyetinin artması nedeniyle de problem oluşturmaktadır (Costerton ve ark., 1994). Gıda işleme makinelerinde oluşan biyofilmler, karıştırma ekipmanlarında sürtünme kayıplarını artırdığından, ısı değiştiricilerde ise ısı aktarım verimini etkilediğinden işlem maliyetini artırmaktadır (LeChavier ve ark., 1988; Costerton ve ark., 1994).

Yıllardan beri, yoğun bir şekilde araştırılan biyofilm tabakası, endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karinalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde “biofouling” olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Hallam ve ark., 2001).

Süt ve diğer gıda sanayilerinde biofouling; ısının yüzeyden akışını geciktirmesi, yüzeydeki sıvının sürtünme direncinin artması ve yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlar yaratmaktadır (Kumar ve Anand, 1998). Boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte (Poulsen, 1999) ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (Jayaraman ve ark., 1997).

### 2.3. Et ve Süt İşletmelerinde Biyofilm

Modern gıda prosesleri, biyofilm gelişimi için geniş yüzey alanları, uzun üretim döngüleri ve ürünlerin üretimdeki yığınları nedeniyle, gıda temas yüzeylerinde bakterilerin biyofilm oluşturmasını desteklerler (Lindsay ve Holy, 2006). Gıda işletmelerinde su giderleri, üretim teknelerindeki çatlaklar ve çizikler, sisteme bağlı sonu olmayan borular, tezgah yüzeyleri, pastörizatörler, sulu ya da glikol ile çalışan soğutma sistemleri, fayans duvarlar, taşıma hattı, musluk yüzeyleri, lavabo, tuvalet yüzeyi, salamura tankları, soğutma odalarının tavanları, soğutma ve haşlama tankları gibi sıvı ile kaplı yüzeylerin biyofilm gelişimi için uygun olduğu bilinmektedir (Zottola, 2001). Bu nedenlerle, biyofilmler süt, peynir, çiğ, pişmiş ve fermente et üreten gıda proses alanlarında sorun oluşturabilmektedir (Lindsay ve ark., 1996; Sharma ve Anand, 2002; Bagge-Ravn ve ark., 2003; Carpentier ve Chassaing, 2004, Gudbjörnsdottir ve ark., 2004; O'Brien ve ark., 2004). *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 bu proseslerde biyofilm oluşturan önemli mikroorganizmalardandır (Costerton ve ark., 1978; Herald ve Zottola, 1987; Vernozy-Rozand ve Roze, 2003).

#### 2.3.1. Et ve süt işletmelerinde *Listeria monocytogenes* biyofilmi

Et ve süt proses çevrelerinde, üretim güvenliğini sürekli tehdit eden *Listeria* türlerini içeren biyofilm gelişimi birçok çalışmada incelenmiştir (Nelson, 1990; Charlton ve ark., 1990; Nickelson ve ark., 1999). *L. monocytogenes*'in paslanmaz çelik yüzeylere tutunarak biyofilm şeklinde gelişebilen bir patojen olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Herald ve Zottola, 1987, Frank ve Kofi, 1990; Lee ve Frank, 1991).

*Listeria*'nın taşıyıcı bantlar, zeminler, kanallar, depolama tankları ve el arabaları gibi yüzeylerde biyofilm oluşturduğu görülmüştür (Cox ve ark., 1989; Charlton ve ark.,1990; Nelson 1990). Ayrıca süt proses alanlarında, proses ve paketleme ekipmanlarında ve özellikle taşıyıcı bantlar ve kanallar gibi ıslak, temizlenmesi zor alanlarda, *L. monocytogenes*'i içeren *Listeria spp.* izole edilmiştir (Nelson, 1990; Charlton ve ark., 1990). Kaliforniya 'da, 1987' de süt proses alanlarında yapılan teftişte, 156 alan örneklenmiş ve 46 alan *Listeria* pozitif çıkmıştır (Charlton ve ark., 1990). Et proses alanlarında yapılan teftişteyse, benzer şekilde, nemin toplandığı tavanlarda, taşıyıcı bantlarda, özellikle kanallarda ve çeşitli ıslak alanlarda *Listeria spp.* izole edilmiştir (Nickelson ve ark., 1999). Sosis soyma makinası, taşıyıcı bantlar ve silindirler, bıçaklar, dilimleyiciler ve paketleme ekipmanları uzun süre ıslak kalan ve temizlenmesi zor alanlardır ve bu nedenle, *L. Monocytogenes* gibi *Listeria spp.*' ler için iyi bir sığınaktır ve biyofilm gelişimi için ideal koşulları sağlar (Nickelson ve ark., 1999).

*L. monocytogenes* et ve süt proses çevrelerinde biyofilm halindeki diğer bakterilerle rekabet edebilme kabiliyetine sahip olan bir patojen olduğu bulunmuştur (Jeong ve Frank, 1994). Bu çalışmaya göre, *L. monocytogenes* hücreleri, rakip bakteri hücrelerine bağlı değişen bir artış göstermiş ve *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Streptococcus spp.* gibi diğer bakteri hücrelerinin azalışı gözlemlenmiştir. Yani, *Listeria spp.* rekabetin etkisiyle daha hızlı üreyerek, diğer hücrelerin ölümüne neden olmuştur (Banks ve Bryers, 1991; Jeong ve Frank, 1994).

Süt proteininin *L. monocytogenes*'in paslanmaz çelik yüzeye tutunmasını artırıcı bir faktör olduğu bilinmektedir (Helke ve Wong, 1992). Barnes ve ark. (1999)'nın yaptığı bir çalışmada, *L. monocytogenes*'i içeren birkaç patojen ile bulaşmış paslanmaz çelik yüzeyler, farklı konsantrasyonlardaki süt ile muamele edilmiş ve % 0.1 konsantrasyondaki sütte bile *L. monocytogenes* hücrelerinin paslanmaz çelik yüzeye zamanla tutunmasının arttığı gözlemlenmiştir. Süt proteininin besleyici etkisinin yanında, relatif rutubetin yüksekliği ve sıvı akışının olması nedeniyle de süt ürünleri üreten işletmelerde *L. monocytogenes*'e ait biyofilmler görülmektedir (Mattila, 1990). Bir çalışmada, taze kesilmiş süt ve peynir altı suyunun bulunduğu, peynir proses alanlarına *L. monocytogenes* hücrelerinin sıkça bulaştığı ortaya çıkmış

ve 9 süt işletmesinden alınan yüzey örneklerinde bütün işletmelerde farklı alanlarda olmak üzere boru, duvar, raf, olgunlaşma oda yüzeyleri, peynir kalıbı ve peynir tezgahlarına *L. monocytogenes* hücrelerinin yapıştığı gözlemlenmiştir (Perni ve ark., 2007).

Etin lifli yapısı ve et proteinlerinin besleyici etkileri nedeniyle *L. monocytogenes* biyofilmi et işletmelerinde de problem oluşturmaktadır (Schwach ve Zottola, 1982). Et işletmeleri ile ilgili yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes*' in et emülsiyonunda paslanmaz çelik yüzeye hücre gelişimi ve tutunması incelenmiştir (Gram ve ark., 2007). Et emülsiyonunda 20 saat içinde, *L. monocytogenes*'in paslanmaz çelik yüzeye  $7 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  tutunması ve  $7 \log_{10}\text{kob}/\text{ml}$ ' den  $9 \log_{10}\text{kob}/\text{ml}$ 'ye kadar artışı gözlemlenmiştir.

### 2.3.2. Et ve süt işletmelerinde *Staphylococcus aureus* biyofilmi

*S. aureus* özellikle et ve süt işletmelerinde yüzeyde biyofilm problemi yaratan patojenlerden bir tanesidir (Costerton ve ark., 1978). *S. aureus* süt proses alanlarında ve pastörizasyon hattında biyofilm oluşturma kabiliyeti olan bir bakteri türü olduğu birçok çalışmada ispat edilmiştir (Costerton ve ark., 1995; Sharma ve Anand, 2002; Oulahal ve ark, 2008). Örneğin, çiğ süt ve çiğ süttten yapılan peynirlerde paslanmaz çeliğe tutunan *S. aureus* biyofilmi ile ilgili yapılan bir çalışmada, *S. aureus*'un, iki farklı sıcaklıkta ( $12^{\circ}\text{C}$  ve  $25^{\circ}\text{C}$ ), çiğ süt, pastörize yağsız süt ve peynir loru ile 5 saat, 1 gün, 2 gün ve 8 gün gibi farklı zamanlarda temasla, paslanmaz çelik yüzeyde hayatta kalma kabiliyetleri gözlenmiştir (Oulahal ve ark, 2008). En iyi tutunma 2. günde iki sıcaklıkta da yaklaşık  $10 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  ile çiğ sütte sağlanmıştır. Beş saat içinde en iyi tutunma her iki sıcaklıkta da yaklaşık  $7 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  ile peynir lorunda görülürken, 8 gün sonrasında  $12^{\circ}\text{C}$ ' deki pastörize yağsız sütte  $8 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  tutunma gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile *S. aureus* biyofilminin oluşumu tek bir parametreye bağlı olmadığı sıcaklık, yüzeye temas süresi ve gıda profiline ve hatta peynir lorundaki mikroorganizmaların *S. aureus* hücrelerinin tutunmasını engellemesi gibi doğal engellere bağlı olduğu görülmüştür. *S.aureus* mezofilik bir bakteridir ancak buzdolabı sıcaklığında da yavaşta olsa gelişebilir. Bu nedenle iki sıcaklıkta da gelişebilmesi normaldir ancak 8 gün sonrasında  $12^{\circ}\text{C}$ ' deki pastörize



yağsız sütte 25°C' den daha iyi bir gelişme kaydetmesi ise biyofilm oluşturmuş bakterilerin düşük sıcaklık gibi stres ortamlarında daha iyi gelişebilmesine bağlanabilir (Costerton ve ark., 1995). En yüksek tutunmanın meydana geldiği çiğ süt ise diğer ürünlerle karşılaştırıldığında protein açısından en zengin olduğundan biyofilm oluşumu için en elverişli ortamdır. Benzer bir çalışmada, paslanmaz çeliğe bakterilerin yapışmasına süt proteinlerinin etkisi araştırılmış ve alfa-kazein, beta-kazein, kappa-kazein ve alfa-laktalbümin proteinleri varlığında *S. aureus* hücrelerinin 20°C' de 2 saatte paslanmaz çeliğe yapışması gözlemlenmiştir. En fazla yapışmanın ise peynir altı suyu proteini olan alfa- laktalbümin de olduğu ortaya çıkmıştır (Barnes ve ark., 1999).

Yine süt proseslerindeki CIP sistemindeki sanitizelerin biyofilm temizliğine etkisini araştırıldığı bir çalışmada fosforik asit içeren güçlü asit *S. aureus* hücrelerinde yalnızca 1,5 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> azalma sağlayabilmiştir (Furukawa ve ark, 2010). Ayrıca yapılan çalışmalarda bu patojenin mutant *agr* ve *sar* gibi genleri oluşturdukları ve bu genlerin dezenfektanlara direnç sağladığı gibi, herhangi bir yüzeyde biyofilm oluşturmasını da kolaylaştırdıkları görülmüştür (Pratten ve ark, 2001).

*S. aureus* et işletmelerinde de problem oluşturmaktadır (Costerton ve ark., 1978). Örneğin bir çalışmada, fermente ya da kuru sosis üreten 7 küçük ölçekli et işletmesinin gıda ile temas eden yüzeylerinden ve makinalarından örnekler alınmış ve sonuç olarak, kıyım makinası ve tezgahlar % 14.29, karıştırma makinası ve doldurma makinasının % 33.33 oranında *S. aureus* pozitif olduğu gözlemlenmiştir (Gounadaki ve ark., 2008). Bu sonuç, çiğ et ya da gıda işleyicilerden, ekipman ve proses çevresine çapraz bulaşma olduğunu göstermiştir. Yine et işletmeleri ilgili yapılan bir diğer çalışmada, işletmede beş yıldır kullanılan paslanmaz çelik materyal, % 5 kıyılmış sığır eti içeren steril suda 24 saat 25°C' de *S. aureus* hücreleri ile inkübe edilmiş, 24 saat sonunda taze kıyılmış sığır eti eskisiyle değiştirilmiştir. Çalışmada 48 saat sonra paslanmaz çelik materyalde, 9 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> *S. aureus* biyofilmi gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile paslanmaz çelik yüzeye tutunarak öncül makromoleküler yüzey oluşturan kıyma parçalarının, etin lifli yapısı nedeniyle ideal bir besi ortamı oluşturduğu görülmektedir (Oulahal ve ark, 2007).

### 2.3.3. Et ve süt işletmelerinde *Esherichia coli* O157:H7 biyofilmi

*E. coli* O157: H7 enfeksiyonları genellikle az pimi et ürünleri ile bağlantılı olsa da salgınlar, çiğ sütün de tüketimiyle ilgili olduğunu göstermiştir (Vernozy-Rozand ve Roze, 2003). Çünkü sığır, *E. coli* O157:H7'nin en büyük rezervuarıdır. Bu patojen sığır eti proses alanlarında, paslanmaz elik yüzeylerde ve taşıyıcı bantlarda sıklıkla bulunur (Rivera-Betancourt ve ark., 2004; Marouani-Gadri ve ark., 2009). Marouani-Gadri ve ark. (2009), kesimhane, et parçalama odası, kemik ayırma odası gibi et proses alanlarından, et ile temastaki paslanmaz elik yüzeylerden ve taşıyıcı bantlardan swablama yöntemi ile örnekler alıp biyofilm oluturmu patojen türleri belirlemişlerdir. Sonuç olarak temizlik ve dezenfeksiyon sonrasında bile başta *E. coli* O157:H7 olmak üzere *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* gibi birçok mikroorganizmanın biyofilmine rastlanmıştır. Bir süpermarkette etin elle işlenmesi, dezenfeksiyonun uygulanmaması, haftada yalnızca bir kez temizlik yapılması nedenleri ile et oğtc gibi ekipmanların yüzeylerinde *E. coli* O157:H7 hücreleri tespit edilmiş ve bu bulamanın salgınlara neden olduğu ortaya çıkmıştır (Banatvala ve ark., 1996). *E. coli* O157:H7'nin gıda alanlarında ve yüzeylerde biyofilm oluşturması salgınların meydana gelmesinin başlıca nedeni olarak grlmtir (Holah ve Kearney, 1992; Zottola ve Sasahara, 1994).

*E. coli* O157:H7 sığır etinin yanında salam, jambon gibi kırmızı et ürünlerine de bulamaktadır (Silagyi ve ark., 2009). *E. coli* O157:H7'nin, sığır eti, salam ve jambon gibi kırmızı et ürünleri varlığında, paslanmaz elik ve cam yüzeylerde, biyofilm oluturabildiği gözlemlenmiştir (Silagyi ve ark., 2009). *E. coli* O157:H7, paslanmaz çelikte ( $5 \log_{10} \text{kob/cm}^2$ ) camdakinden ( $3 \log_{10} \text{kob/cm}^2$ ) daha iyi biyofilm oluşturmuştur. Aynı çalışmada,  $5 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  tutunma gözlenmiş paslanmaz çelikler, oda sıcaklığında, sığır eti, salam ve jambon ile 30 dak temas ettirildikten sonra her bir paslanmaz elik plaka 3 kez steril su ile yıkanmıştır. Sonuç olarak, paslanmaz elik yüzeye 30 dak süre içerisinde sığır eti, salam ve jambon yüzeylerinden sırasıyla yaklaşık 3, 3,5 ve 3,5  $\log_{10} \text{kob/cm}^2$  *E. coli* O157:H7 hresi bulaştığı ortaya çıkmıştır.

Paslanmaz çeliğe *E. coli* O157:H7 tutunması araştırılan başka bir çalışmada, % 1 rekonstitute yağsız süt ve seyreltik et suyunda 23°C' de paslanmaz çelik yüzeyde sırasıyla yaklaşık 3,5 ve 5 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup>' yi bulan biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (Hood ve Zottala, 1997). Seyreltik et suyu, % 1 rekonstitute yağsız süte göre daha besleyicidir. Et suyundaki et proteinleri ve et parçalarının lifli yapısı tutunmayı artmaktadır (Schwach ve Zottola, 1982). Yağsız sütte yalnızca protein tutunmayı artırıcı etki yapar (Helke ve ark., 1993). Bu nedenle, et suyunda yağsız süttten daha iyi bir tutunma gözlenmiştir.

*E. coli* O157:H7 karkaslardan ve karkas yıkama sularından sıklıkla izole edilmektedir (Bacon ve ark., 2000). *E. coli* O157:H7 gibi patojenler, asidik et yıkama atık suları varlığında hayatta kalabilmektir (Samelis ve ark., 2001a,b, 2002, 2004, 2005). Karkas yıkama suları varlığında, paslanmaz çelik parçalarda, farklı kültür çevrelerinde, asit direncini sürdüren ve biyofilm oluşturan *E. coli* O157:H7 potansiyelini araştıran Skandamis ve ark. (2009), karkasların bir kısmını su ile, bir kısmını ise laktik asitle yıkanmışlar ve bu karkas yıkama sularında *E. coli* O157:H7 hücrelerini 35°C' de 24 sa geliştirmişlerdir. Laktik asit uygulanmış ya da sadece su uygulanmış karkas yıkama sularına, tekrar suda ve 50 ppm peroksiasetik asit (PAA) içeren 40 ml çözeltide 45 sn işlem uygulanmıştır. Su ile karkas yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7 hücrelerinde, suda ve PAA'da sırasıyla 1,8 ve 1,9 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> azalma görülürken, laktik asit ile yapılan karkas yıkama suyunda gelişen *E. coli* O157:H7 hücreleri, suda ve PAA'da sırasıyla 1,1 ve 0 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> azalma göstermiştir. Bu çalışmada öldürmeyen konsantrasyonlardaki asidik ön yıkama *E. coli* O157:H7 hücrelerinin direncini arttırmıştır. Nitekim asidik karkas yıkama suları varlığında patojenlerin aside adaptasyon sağladığı bilinmektedir (Samelis ve ark., 2001a,b, 2002, 2004, 2005).

## 2.4. Biyofilmin Önlenmesi

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde ilk aşama biyofilm oluşmadan gerekli tedbirlerin alınmasıdır (Meyer, 2003). Ekipmanların dizaynı ve yüzey materyali seçimi biyofilm oluşumunun engellenmesi için önemli bir detaydır (Maukonen ve ark., 2003). Ekipmanlar kirin birikmesini engelleyecek ve kolay

temizlenecek şekilde dizayn edilmelidir ve ekipmanlar temizliğe uygun materyallerden yapılmış olmalıdır (Jackson, 1985; Giese, 1991). Mekanik silme, fırçalama, cilalama ve elektrolitik silme açısından en uygun proses ekipman yüzeyi çeliktir (Maukonen ve ark., 2003). İstenmeyen biyofilmin etkili kontrolü, yüzeyden çıkarılmak istenen mikroorganizmanın ve protein, yağ vb. gibi bulaşmış atık maddenin doğasını ve tipini anlamak ile başarıya ulaşır (Mosteller ve Bishop, 1993; Wirtanen ve ark., 2000). Buna ek olarak, deterjan ve dezenfektan seçimi, özellikle korozyon ve son ürünlerdeki duyuşal özellikler açısından etkinliğine, güvenliğine ve kolay çıkarılabilirliğine bağılıdır (Mosteller ve Bishop, 1993; Wirtanen ve ark., 2000). İşletmelerde, belirli aralıklarda işletmeye uygun ve etkili bir temizlik işlemiyle mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve bunu etkili bir dezenfeksiyon uygulaması izlemelidir. Gıda işletmelerinin büyük bir kısmında, temizlik sırasında biyofilmin uzaklaştırılması için yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır. Mekanik işlemler arasında yer alan otomatik fırça veya yüksek basınçla temizlik yapılması, jel temizleyiciler veya düşük basınçla yapılan temizlikten daha etkilidir (Meyer, 2003). Son yıllarda biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri arasında elektriksel alanlar, katalize modifiye yüzeyler, ultrason, enzimler, amonyak ve formaldehit, deterjan maddeleri, yüksek basınçlı temizleme sistemleri kullanımı tercih edilmektedir. Ancak her birinin etkinliği uygulanan yüzeye, biyofilm oluşturan bakteri türüne ve uygulama şekillerine göre farklılık gösterebilmektedir (Meyer, 2003).

Planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm oluşturan hücreler; antibakteriyel maddelere, iodin, iodinpolivinil-pirollidon kompleksi, klorin, monokloramin ve peroksijenler gibi biositlere ve ısıya karşı daha dayanıklıdır (Cloete, 2003). Bu nedenle biyofilm üzerine yapılan araştırmaların bir diğere yönü de mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve her bir mikroorganizma için farklı kompozisyona sahip biyofilmin engellenmesi ve/veya ortadan kaldırılması üzerinedir (Meyer, 2003). Biyofilm hücrelerinin antibakteriyel maddelere karşı dayanımının, planktonik hücrelerden en az 500 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Costerton ve ark., 1995).

### 2.4.1. Biyofilm tespiti

Kalitenin belirlenmesinde, düzenli olarak gıda işleme yüzeylerinden, karkaslardan, boru sistemlerinden ve sıvı örneklerinden alınarak mikrobiyolojik analiz yapılmasının gerekliliği yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Bu noktada analizde koloni sayısının az olmasının düşündürücü olduğu, çünkü sayılabilen bakterilerin, olması düşünülen toplam bakteri sayısının ancak % 1-3' ü olduğu bildirilmiştir. Geriye kalan % 97-99' unun sistemde tutunmuş olarak bulunduğunun göz ardı edilmemesi gerektiği ortaya konmuştur. Eğer olgun bir biyofilm sanitasyon veya su akım hızı ile parçalanmamışsa ya da bakteri bırakacak olgunluğa ulaşmamışsa tespit edilmesinin çok güç olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (Joseph ve ark., 2001; Sails ve ark., 2002; Trachoo ve ark., 2002).

Gıda alanlarında, biyofilm varlığını kabaca gösteren bazı yüzeysel tespit yöntemleri kullanışlı olabilmektedir. Bu tespit yöntemleri arasında gösterebileceğimiz en yaygın bilinenleri swaptaki renk değişimi veya yoğun bir şekilde kontamine olmuş yüzeyde gözlemlenen görsel değişimlerdir (Ölmez, 2009). Ancak, zaman alsa da, üreticiler işletmelerde mikrobiyel kontaminasyonun tespiti amacıyla ürün örneklerinden agar besiyerlerine yapılan ekim ve swaplama gibi dolaylı metotlara daha çok güvenmektedir (Brooks ve Flints, 2008).

Swaplama ve agara ekim gibi geleneksel metotlar dışında bakteriyel ATP üretim miktarı esas alınarak biyofilm miktarını belirleyen biyolimünans yöntemi kullanışlı bir yöntem olarak gösterilmektedir (Ölmez, 2009). Ancak bu yöntemle, ince biyofilm tabakalarının tespiti zordur. Direnç ölçümleri, kalorimetre ve akış sitometrisi teknikleri ürüne veya işletmeden alınan örneklere uygulanabilen ve diğerleri ile karşılaştırıldığında daha hızlı tespit metotları olarak gösterilmiştir (Brooks ve Flints, 2008). Nitekim akış sitometrisi yöntemi dışındaki yöntemler anında müdahale veya süreç kontrolü amaçları için halen zaman alıcı yöntem olarak düşünülmektedir (Brooks ve Flints, 2008).

Anında müdahale açısından, sistem içi su hattında veya soğutma suyu sistemlerinde biyofilm denetimi için kullanılan, patentli bir elektrokimyasal düzeneğin, hat

üzerinde veya tankta biyofilm aktivitesini denetlemek için kurulabileceği gösterilmiştir (Brooks ve Flints, 2008).

#### **2.4.2. Kimyasallarla biyofilmin önlenmesi**

Biyofilm temizliğinde amaç EPS tabakasının parçalanmasıdır (Brooks ve Flints, 2008). Biyofilm organizmalarını yok etmek veya ortadan kaldırmak için, biyosit EPS'e nüfuz etmelidir ve mikrobiyel hücreye geçişi sağlanmalıdır (Meyer, 2003). EPS'nin kimyasal bileşimi biyofilm çeşitlerine göre değiştiğinden, spesifik olmayan mekanizmalar tercih edilmektedir (Jang ve ark., 2006). Biyofilm uzaklaştırılmasında sıklıkla klor, iyot, dörütlü amonyum bileşikleri (KAB) ve peroksitler ve perasetikler kullanılmaktadır (Sharma ve Anand, 2002; Brooks ve Flints, 2008).

Biyofilm oluşturan bakteriler, planktonik hücrelere göre sıcaklık, ışık, kuruma gibi olumsuz çevre koşulları ile antibiyotik ve dezenfektanlara karşı daha fazla dirençlidirler (Şener ve Temiz, 2004). Planktonik hücreler buldukları ortamda antimikrobiyal maddelerle her yönden, biyofilm oluşturan hücreler ise yalnızca tek yönden karşı karşıya gelmektedir. Biyofilmler temizlik ve dezenfektan çözeltilerinin difüzyonunu ve iç kısımlardaki hücrelere nüfuz etmesini engeller. Biyofilm oluşumu sırasında hücreler tarafından oluşturulan EPS matriksleri difüzyon bariyeri ve absorbant görevi görür. EPS matriksleri mikrobiyal gelişimi engelleyen katyonları, toksik metal iyonları ve biyofilm ile temas eden bazı maddeleri bağlamaktadırlar. Ayrıca su tutma kapasitesi yüksek jel oluşturarak da bakterilerin, susuzluğa karşı dirençlerini arttırmaları (Şener ve Temiz, 2004).

Biyofilmler bunların yanı sıra antimikrobiyal maddelerin parçalanmasına neden olan enzimleri üreterek bu maddeleri etkisiz hale de getirebilmektedirler. Biyofilmlerin antimikrobiyal maddelere karşı dirençleri biyofilm yaşının artmasıyla doğru orantılı olarak artmaktadır (Şener ve Temiz, 2004). Bu nedenle yüzeylerde biyofilm oluşumunun kısa sürede önüne geçmenin ve gerekli önlemler alınmasının ayrı bir önemi vardır. Biyofilmlerde bakteri hücrelerinin EPS oluşturarak meydana getirdikleri üç boyutlu matriks yapı bozulduğunda antimikrobiyal maddelere karşı dirençleri azalmakta veya kaybolabilmektedir (Gibson ve ark., 1999). Bu nedenle, gıda

işletmelerinde uygun aralıklarda işletmeye uygun ve etkili bir temizlik işlemi uygulanarak mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve bu işlemi etkili bir dezenfeksiyon uygulaması izlemelidir. Temizlik uygulaması dezenfeksiyon işleminin etkinliğini direkt olarak etkilemektedir. Temizlik işleminin yüzeylerdeki mikroorganizma düzeyinde yaklaşık  $1 \log_{10} \text{kobcm}^2$  azalma meydana getirdiği ve mikroorganizma gelişimini destekleyen ve dezenfektanları inaktif hale getiren maddelerin uzaklaştırılmasını sağladığı da belirtilmektedir (Gibson ve ark., 1999). Sonuçta da dezenfektan çözeltileri bakterilere daha kolay ve etkili bir biçimde ulaşabilmektedir. Bütün bunların yanı sıra, yüzeylere uygulanan deterjan ve saniterlerin yüzey özelliklerini değiştirerek bakterilerin bağlanma derecesini azalttığına da değinilmektedir (Sinde ve Carballo, 2000).

Gıda işletmelerinde yağ ve protein kalıntılarını temizlemek için deterjan görevini yapan alkali bileşiklerin yanı sıra metal bağlayıcılar ve şelatör ve anyonik maddelerin kombinasyonu kullanılmaktadır (Ölmez, 2009). Hatta et sektöründe temizlik işleminde en önemli nokta olan yağların uzaklaştırılmasının (yağ çeşitlerine bağlı olarak) son durulamanın sıcak su ile yapılmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Temizlik maddesinin  $50^{\circ}\text{C}$ 'de uygulanması ve bekleme süresinin 20–25 dak olması gerektiği bildirilmektedir (Başkaya ve ark., 2009). Bu süre içinde proteinler, karbonhidratlar, tuzların çözülüp, yağların emülge edileceği ve yapılan sıcak su durulaması ile ortamdan uzaklaştırılacağı belirtilmiştir. Sadece sıcak su ile yapılan bir temizlik işleminin yağların ancak % 95' ni giderdiği, geride kalan % 5' inin ise kontaminasyon yaratıcı bir ortam olduğu bildirilmiştir. Uygun özellikteki temizlik maddelerinin kullanılması ile % 100 temizlemenin gerçekleştirildiği ve temizlik maddesinin konsantrasyonunu artırmanın daha iyi sonuç vermediği belirtilmektedir (Öztan, 1993).

Çökmüş materyaller ile kirlenmiş yüzeyleri temizlemek için asit temizleyicilerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. İyonik olmayan yıkama maddeleri köpüklenmeyi kontrol ettiği ve iyi bir emülsifiyer oldukları içinde tercih edilmektedir. Temizleme çözeltileri özenli bir şekilde içeriği belirlenmeli ve hazırlanmalıdır. Cam, seramik gibi yüzeyler alkali veya iyonik olmayan deterjanlar ile temizlenirken, paslanmaz çeliğin temizlenmesi için alkali veya asit deterjanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Temizleme işleminde, kirliliğin tipine ve tekrar çökme durumuna göre 40-90°C arasında sıcaklık uygulanır (Ölmez, 2009). Bu sıcaklıklarda temizleme işlemi yüzeye tutunmuş olan mikroorganizmaları % 90 oranında ortamdaki uzaklaştırır da bunların tümünü öldürmez. Bakteri bir başka alana tekrar yapışır ve biyofilm oluşturur.

Biyofilm temizliğinde kullanılan klor ve klorlu bileşikler, bakteriler, küfler, mayalar, bakteriofajlar ve bazı virüsleri içine alan oldukça fazla çeşitte mikroorganizmaya ve mikroorganizma sporlarına karşı etkilidirler. Hipokloritler, özellikle sodyum hipoklorit (NaOCl) ve kalsiyum hipoklorit  $Ca(OCl)_2$ , gıda üretim alanlarında en çok kullanılan klorlu bileşiklerdir. Ayrıca gaz formundaki klor ve  $ClO_2$  de gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Marriott, 1989). Mikrobisidal etkilerini hücre membranına zarar vererek, enzim inhibisyonuna neden olarak, DNA' yı etkileyerek, sitozinin toksik N-klor bileşiklerini oluşturarak, amino asitlerin nitril ve aldehitlere oksidatif dekarboksilasyonuna neden olarak gösterebilmektedirler (Marriott, 1989). Hücre membranı fonksiyonlarının bozulması, hücre içeriğinin dışarı sızması veya hücre dışındaki besin öğelerinin hücre içine alınmasının engellenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. HOCl, hücre içine girerek hücre metabolizmasında önemli görevleri olan enzimlerin sülfidril gruplarını okside ederek enzim inaktivasyonuna neden olmaktadır (Marriott, 1989). Bu maddelerin geniş spektrumlu ve ucuz olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmalarına karşılık kullanılmalarını sınırlayan bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin bu dezenfektanlar ortamda bulunabilecek organik maddelerden olumsuz etkilenebilirler (Marriott, 1989; Hayes, 1992). Organik maddeler, bu klorlu bileşikler ile kompleks oluşturarak etkinliklerini azaltmaktadırlar. Oluşan bu komplekslerin kanserojenik olduğu da rapor edilmiştir (Williams ve Worley, 2000). Bu nedenle temizlik işlemi uygulanmış yüzeylerde kullanılmaları önerilmektedir. Başka dezavantajları ise yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında insan derisini tahriş edebildikleri gibi paslanmaz çelik ve diğer metaller üzerinde yüksek korozyon etkilerine sahiptirler (Hayes, 1992). Sıcaklığın artırılması bu etkilerinin artmasına neden olmaktadır

Biyofilmle mücadelede aktif klorinin öncelikle tercih edilmesinin sebebi, mikroorganizmaları öldürmesi yanı sıra, yüzeyden EPS' in uzaklaştırılmasını sağlamasıdır (Meyer, 2003). Bir biyofilm içindeki bakteri sayısını azaltmak için 1000



ppm' den fazla aktif klorin konsantrasyonu gerekli iken, planktonik hücreler için 10 ppm yeterli olmaktadır. Lee ve Frank (1990) ise paslanmaz çelik üzerindeki *L. monocytogenes* biyofilmini inaktif etmek için 100 mg/l konsantrasyonda sodyum hipoklorit çözeltisinin 65°C' de 5 dakika ve 72°C' de 1 dak süre ile ısıl işleme ihtiyaç duyduğunu tespit etmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda klorlu bileşiklerde pH'nın önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Şener ve Temiz, 2004). Yapılan bir çalışmada, süt işletmelerinde kullanılan dezenfeksiyon metodunun, buhar kullanımı yerine klorlu bileşiklerin kullanımı olarak değiştirildiğinde bakteriler tarafından hipoklorite karşı yüksek düzeyde direnç meydana geldiği saptanmıştır (Başkaya ve ark., 2009). Ayrıca gıda işletmelerinde yüzeylerden ve ekipmanlardan izole edilen *S. aureus*'un klora karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği bildirilmiştir (Toyoda ve ark., 1982; Fitzgerald ve ark., 1993). Başka bir çalışmada, hipoklorit asitin, *Listeria* türlerine karşı, bakterinin hücre duvarı yapısını bozması ve etkili bir glikoprotein parçalayıcısı olması nedeniyle, KAB ve iyodoforlardan daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (Frank ve Koffi, 1990; Helke ve Wong, 1992; Helke ve ark., 1992).

İyotlu bileşikler de klor ve klorlu bileşikler gibi halojen dezenfektanlardır. Dezenfeksiyon uygulamalarında kullanılan başlıca iyot bileşikleri iyodoforlar ve alkol-iyot çözeltileridir (Marriott, 1989). Bu bileşikler pH değişimlerinden çok fazla etkilenmezler. Buna karşılık proteinlerle reaksiyona girerek istenmeyen ürünlerin ortaya çıkmasına ve üründe renk değişikliklerine neden olabilmektedirler (Hayes, 1992; Temiz, 2001). Ayrıca bazı plastik materyaller iyodu absorplayabilirler ve renklerinde ağarma meydana gelebilir (Hayes, 1992).

Gıda endüstrisinde, biyofilm temizlenmesinde KAB gibi yüzey aktif maddelerden de yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır. KAB, gram-pozitif bakteriler üzerinde daha fazla etkilidirler. Ancak bazı *Staphylococcus* türlerinin KAB' lara karşı direnç sağlayan genleri kodlama yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir (Sundheim ve ark., 1998; Grönholm ve ark., 1999). Bu bileşikler hücre membranının geçirgenliğini bozarak ve hücre proteinlerini denatüre ederek hücre ölümlerine neden olmaktadır (Marriott, 1989; Williams ve Worley, 2004). Dezenfektanın pozitif yüklü kısmı, bakteri hücresinin membran yüzeyinde bulunan fosfolipidlerin negatif yüklü fosfat

kökü ile reaksiyon vermektedir. Bu durum, membranın yarı geçirgen özelliğini bozar ve membranda bulunan fosfor, azot, protein, lipid ve diğer önemli maddeler arasındaki bütünlük bozulur. Dezenfektan hücre içine girdikten sonra da etkisini sürdürerek protein denatürasyonu ile enzimleri inaktive etmektedir (Arda, 1997). Mikroorganizmalar üzerine etkileri hafif alkali ortamlarda fazladır ancak pH 5 değerinin altında aktivitelerinde hızlı bir azalma görülmektedir (Hayes, 1992). Bu dezenfektanlar organik maddelere, klorlu ve iyotlu bileşiklerden daha fazla dayanıklıdır. (Hayes, 1992; Grönholm ve ark., 1999). KAB' lar surfektan özelliğe sahip oldukları için durulama işlemlerinden sonra yüzeylerde kalabilmektedirler. Yüzeylerde kalan dezenfektan filmi sonraki bakteriyel gelişimi engelleyebilmektedir (Hayes, 1992). Ancak, kalıntı sorunu nedeniyle gıda ile temas eden yüzeylerde kullanımı önerilmemekte, daha çok taban, duvar ve gıda ile temas etmeyen ekipman ve diğer yüzeylerin dezenfeksiyonu için başvurulmaktadır. Yapılan bir çalışmada, KAB' ların işletme yüzeyleri ve ekipmanlarına uygulanması sonucunda *L. monocytogenes*' in bu bileşiklere karşı adaptasyon kazanabileceği, fakat yüksek konsantrasyonda BC (Benzalkonium klorid) bileşiğine adaptasyon sağlayamayacağı belirtilmiştir (Aase ve ark., 2000).

Peroksitler ve perasetik asitler gibi oksidan bileşikler düşük konsantrasyonlarda, olumsuz çevre koşullarında ve organik madde varlığında oldukça fazla etkilidirler (Şener ve Temiz, 2004). Antimikrobiyal aktivite spektrumu geniştir. *Staphylococcus* türlerinde bulunan enzim sistemlerinin hidrojen peroksidi inaktive ettiği bildirilmektedir (Sander ve Wilson, 1999). Oksidan maddeler deri ve mukoz mebranlara karşı irritan özelliğe sahiptirler. Bazı alet ve ekipmanlara karşı korozif olabilmektedirler (Reuter, 1998; Sander ve Wilson, 1999). Peroksitler ve perasetik asitler, seyreltildiğinde kolayca CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve suya dissosiyasyon olarak etkisini kaybedebilmektedirler (Grönholm ve ark., 1999). Paslanmaz çelik üzerinde *Listeria* ve *Pseudomonas*'ların oluşturduğu biyofilmlerin yok edilmesinde peroksiasetik asit gibi oksidatif maddeler kullanılmaktadır (Jang ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada, et işletmelerinde, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* ve *S. aureus* ile kontamine edilen paslanmaz çelik yüzeylerde sodyum hipoklorit ve perasetik asitin etkinlikleri incelenmiş ve sodyum hipokloritin analiz edilen bakteriler üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Rossoni ve Gaylarde, 2000). Bu çalışma sonucunda

perasetik asit araştırmacılar tarafından et işletmelerinde dezenfeksiyon ajanı olarak önerilmemektedir.

### **2.4.3. Biyofilmin önlenmesi için HACCP uygulamaları**

Oluşmuş biyofilmi tamamen ortadan kaldırmak oldukça zor olduğundan biyofilm oluşumunun önlenmesi gerekmektedir. Bu yüzden, işletmelerde hijyenik açıdan bir zorunluluk olan HACCP uygulamaları, biyofilm mücadelesinde önemli hale gelmiştir (Ölmez, 2009). HACCP sisteminin en önemli amacı sorunun oluşmadan önlenmesidir ki bu da biyofilm oluşumunu kontrol altına almak için kullanılan ilk prensiptir. Bu amaca hizmet etmek için HACCP programının uygulanması 7 temel prensip içermektedir (Sharma ve Anand, 2002). Bu prensipler sırasıyla tehlike analizi, kritik kontrol noktalarının belirlenmesi, kabul sınırları ve kıstasların oluşturulması, izlemenin yürütülmesi, düzeltici işlemlerin uygulanması, doğrulama ve kayıt tutma şeklinde sıralanabilir. Çoğu durumlarda, fiziksel ve kimyasal testlerin kullanımı ve gözlem ile kritik kontrol noktalarının izlenmesi en iyi şekilde gerçekleştirilebilir. HACCP planının geliştirilmesinde, bakteriyel biyofilmlerin işletmelerin işlem sonrası alanlarındaki rolü ve dağılımı bir bakış açısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada, pastörizasyon sonrası hatlarda gram negatif bakterileri barındıran biyofilm tabakası olduğu tespit edilmiştir. Her işletmede farklı bölümlerde, farklı mikrofloranın bulunmasının sebebi, gıda temas yüzeylerinde bakteri ve besin kalıntılarının çatlaklar, vana, contalar ve ölü noktalar gibi temizlenmesi zor alanlarda oluşan birikim sonucu bulaşmanın düzgün bir dağılım göstermemesidir. Mikrofloradaki büyük farklılık HACCP sisteminin uygulanmasında önce her işletmedeki biyofilm durumunun farklı noktalarda göz önüne alınarak değerlendirilmesinin gereğini ortaya koymuştur (Sharma ve Anand, 2002).

### **2.5. Midye kabuğu tozu (MKT)**

Midye kabukları gıda katkı maddesi ve sıvıcılıkta dolgu malzemesi olarak kullanılmasına rağmen kullanılan miktarın çoğu artık ürün olarak kalır (Sawai ve ark., 2001a ve b). Çünkü midye toplandığında kabukların büyük miktarı deniz

kenarına dağılır ve yumuşakçaların iç organlarından çıkan ağır metaller, kötü koku ve toprak kirliliği gibi tehlikeli sosyal ve çevresel problemler yaratırlar (Bae ve ark., 2006). Bu nedenlerle midye kabuğu kullanımı için farklı uygulamalar ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Sawai ve ark., 2001a ve b).

Midye kabuğunun ana maddesi kalsiyum karbonattır ( $\text{CaCO}_3$ ) ancak  $700\text{ }^\circ\text{C}$  ve üzeri sıcaklıklarda ısıtılınca uygulandığında  $\text{CaCO}_3$ , antibakteriyel etkisi olan kalsiyum okside ( $\text{CaO}$ ) dönüşür.  $\text{CaO}$  (MKT)' in güçlü antimikrobiyel etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Sawai ve ark., 2001a ve b). MKT' nin alkalitesi ile ilgili yapılan deneyler sonucunda, MKT çözeltisinin farklı konsantrasyonlarda pH' sınırı 12'den yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bunun sonucunda kuvvetli alkaliteye sahip olan MKT çözeltisinin antimikrobiyel etkisinin, içeriğindeki hidroksit iyonunun ( $\text{OH}^-$ ) hücre duvarını aşarak hücreyi hidroliz etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hisao ve Hiroyuki, 1999).

Japonya Gıda Analiz Merkezi'nin yaptığı araştırmalarda, MKT çözeltisinin *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. Fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutants*, *Legionella spp.*, *Campylobacter spp.* üzerinde üremeyi durdurucu etkisi ölçülmüştür (Hisao ve Hiroyuki, 1999). Her bir bakteri için yaklaşık  $6 \log_{10}\text{kob/ml}$  içeren bakteri solüsyonları % 0.15 konsantrasyonlu MKT çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 5 dak' da sonuçlar belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus mutants*, *Campylobacter spp.* bakterileri  $1 \log_{10}\text{kob/ml}$ ' ye kadar azalmalar göstermişlerdir. *S. aureus*  $5 \log_{10}\text{kob/ml}$ , *Enterococcus faecalis*  $4 \log_{10}\text{kob/ml}$ , *Legionella spp.*  $2 \log_{10}\text{kob/ml}$ 'ye kadar azalmıştır. Benzeri bir çalışmada, Bae ve ark. (2006),  $\text{CaO}$ 'in *E.coli*, *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* üzerindeki antimikrobiyel etkisini araştırmıştır. Herbir bakteri için % 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 konsantrasyonlardaki  $\text{CaO}$  çözeltisinin 15 san, 30 san, 1 dak, 2 dak, 3 dak, 5 dak, 10 dak ve 30 dak' lardaki bakterisidal etkisi ölçülmüştür. Hiçbir bakteri % 0.01 ve 0.03 konsantrasyonlu  $\text{CaO}$  çözeltisinden etkilenmemiştir, fakat % 0.05 çözeltisinin 10 dak muamelesinde *E. coli* (%99;  $2.78 \log_{10}\text{kob/ml}$ ), *L. monocytogens* (% 45;  $1.44 \log_{10}\text{kob/ml}$ ) ve *S. typhimurium* (%70;  $2.08 \log_{10}\text{kob/ml}$ ) için en iyi antimikrobiyel etki tespit edilmiştir.

Midye kabuğu tozunu çalışıldığı başka bir çalışmada, *E. coli* için, ml'de 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 mg midye kabuğu tozu içeren çözeltilere 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dak uygulanmıştır (Sawaii ve ark., 2001a). Konsantrasyon arttıkça antimikrobiyel etki artarken, en iyi etki 5.5 log<sub>10</sub>kob/ml azalma ile 5 dak' da 0.20 mg/ml MKT çözeltisi uygulandığında tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, *S. aureus* için ml'de 0.1, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg midye kabuğu tozu içeren çözeltiler 0, 2, 4, 6 ve 8 dak uygulanmıştır. *E. coli*' de olduğu gibi *S. aureus*'da da konsantrasyon arttıkça antimikrobiyel etki artmıştır. En iyi etki yaklaşık 4 log<sub>10</sub>kob/ml azalma ile 4 dak 1.5 mg/ml MKT çözeltisi uygulandığında tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada aynı mikroorganizmalar ve aynı konsantrasyonlu midye kabuğu çözeltileri kullanılmıştır (Sawaii ve ark., 2001b). Diğer çalışmadan farklı olarak midye kabuğu tozu uygulanmadan önce 1000 °C' de 1 sa ısıtma işlemi uygulanmış ve bütün konsantrasyonlar için 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 dak işlem süreleri uygulanmıştır. *E. coli* için ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış midye kabuğu çözeltileri karşılaştırıldığında 5 dak için 0.20 mg/ml MKT çözeltisinde ısıtma işleminin yaklaşık 1 log<sub>10</sub>kob/ml antimikrobiyel etkiyi azalttığı, 0.05, 0.10 ve 0.15 mg/ml MKT çözeltisinde ısıtma işleminin yaklaşık 1 log<sub>10</sub>kob/ml antimikrobiyel etkiyi artırdığı gözlemlenmiştir (Sawaii ve ark., 2001a ve b). *S. aureus*' ta ise önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Midye kabuğu tozu çözeltisi ile yıkamanın sosis ve tavuk derisi yüzeylerinde de bazı patojenlerin azalmasına ve bu patojenlerin 7 gün süre ile üremesinin engellenmesine etkili olduğu görülmüştür (Çeğri-Mehmetoğlu ve Yaldirak, 2009; Bodur ve ark., 2009). Çağrı-Mehmetoğlu ve Yaldirak (2009), MKT'nin tavuk derisi üzerine bulaştırılmış *S. enteritidis* ve *L. monocytogenes* patojenlerini temizleme etkisini araştırmıştır. Her bir mikroorganizma için % 0, 0.1 ve 0.5 konsantrasyonlu MKT çözeltileri, 10 ve 30 dak süre ile uygulanmış ve ilk gün (0. gün) ve 7 gün depolama sonrasında tavuk derisinde mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. *L. monocytogenes*' in 10 ve 30 dak % 0.1 ve 0.5 konsantrasyonlu MKT çözeltisi uygulanmış hücrelerinde yaklaşık 6 log<sub>10</sub>kob/g azalma meydana gelirken aynı süre ve konsantrasyonlarda *S. enteritidis*' in hücrelerinde sırasıyla yaklaşık 4.5 ve 6 log<sub>10</sub>kob/g azalma gözlemlenmiştir. 7 gün depolama süresi hücre azalmasında farklılık yaratmamıştır. Aynı grubun başka bir çalışmasında, 10 ve 30 dak işlem süresi uygulanarak, % 0.0, 0.05 ve 0.1 konsantrasyonlu MKT çözeltisinin, sosis

yüzeyinde gelişen *L. monocytogens* ve *E. coli* O157:H7 hücrelerinin üremesini durdurucu etkisi araştırılmıştır (Bodur ve ark., 2010). *L. monocytogens* hücrelerinde, 10 ve 30 dak % 0.05 ve 0.1 konsantrasyonlu MKT çözeltisi uygulandığında, sırasıyla 3.5 ve 3.8 log<sub>10</sub>kob/g azalma görülürken, % 0 konsantrasyonlu MKT çözeltisinde sırasıyla 2.4 ve 2.7 log<sub>10</sub>kob/g' dır. *E. coli* O157:H7 hücrelerinde, 10 dak % 0, 0.05 ve 0.1 konsantrasyonlu MKT çözeltisi uygulandığında, sırasıyla 4.6, 5.0 ve 5.9 log<sub>10</sub>kob/g azalma gözlenmiştir. Benzer olarak 30 dak işlem uygulandığında, sırasıyla 4.1, 5.0 ve 5.7 log<sub>10</sub>kob/g azalma kaydedilmiştir.

MKT, gıda maddelerinin raf ömrünü arttırmak için de kullanılmaktadır (Sawai ve ark., 2001a ve b). Örneğin, Choi ve arkadaşları (2006) Kore'nin geleneksel fermente ürünü olan Kimchi için MKT çözeltisinin raf ömrüne etkisini araştırmışlardır. Kimchi'nin laktik asit solüsyonuna % 0.05, 0.1 ve 0.5 oranında MKT katılmış ve 15 gün fermente edilmiştir. MKT katılan laktik asit solüsyonlarında, toplam bakteri sayısı, katılmayanlara göre azalmış ve daha hijyenik ve kaliteli ürünler elde edilmiştir. MKT' nin raf ömrü üzerine etkisi araştırılan başka bir çalışmada, taze soya peynirine % 0.05 ve 0.1 oranlarında MKT katılmış ve raf ömrünü 2 gün arttırdığı gözlenmiştir (Kim ve ark., 2007).

MKT çözeltisinin sebze, meyve ve yenilebilir istiridyelerin zehirli ilaçlar ve hormonları yok etme kabiliyetiyle ilgili de araştırma yapılmıştır (Hisao ve Hiroyuki, 1999). Bunun sonucunda, % 0.1 konsantrasyonlu MKT çözeltisi ve su ile yıkama uygulandığında, Japonya' da chingen denilen sebzedeki triphorine içerikli saprol zirai ilacını, suyun % 15, MKT çözeltisinin ise % 41 yok etme oranı tespit edilmiştir. Yine phthalate estersin hormonuna karşı da yüksek yok etme oranına sahip olduğu görülmüştür (Hisao ve Hiroyuki, 1999).

## **BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD**

### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, Ankara Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen *L. monocytogenes* ATCC 7677, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 inokulasyonları kullanılmıştır. Sakarya ilinde faaliyet gösteren Milkon Süt ve Gıda Mamülleri San. ve Tic. A.Ş.'nin verdiği peynir altı suyu tozu kullanılmıştır. Peynir altı suyu tozu, peynir altı suyu'nun püskürtmeli kurutucuda veya silindir kurutucuda kurutulması ile elde edilmektedir. Elde edilen ürünün nem miktarı % 2, protein miktarı % 5-6, kül miktarı % 5, yağ miktarı % 0, karbonhidrat (laktoz) miktarı % 83-85 arasında değişmektedir (Yerlikaya ve ark., 2010). Tezgah yıkama suları, Sakarya ilinde faaliyet gösteren, günde 300 kg kapasiteli, et ve sucuk işleyen Z&B Bozkırlar Et Ürünleri Topt. ve Per. Tic.'ten temin edilmiş ve laboratuara örnek alındıktan hemen sonra portatif buzdolabı ile taşınmışlardır (TK Minimate 90atk4). Et tezgahı yıkama suları, 3 sığırın kesiminden bir gün sonra karkas parçalama esnasında toplanmıştır. Et tezgahı yıkama suyunda kuru madde tayini TS 1743 ISO 1442, protein tayini AOAC 990.03, yağ tayini TS 1744, kül tayini TS 1746 metodlarına göre yapılmış, karbonhidrat miktarı ise kuru madde miktarından protein, yağ ve kül miktarının çıkarılması sonucu belirlenmiştir. Et tezgahı yıkama suları için ocak, mart ve mayıs aylarında alınan 3 örnek, 3 tekrerrü oluşturulmaktadır. Tek peynir altı suyu tozundan oluşturulan peynir altı suları için 3'er tekrerrü yapılmıştır. Steril su ve midye kabuğu tozu çözeltisinin farklı konsantrasyonları için de yine 3'er tekrerrüle çalışılmıştır. Üzerinde biyofilm oluşması amacıyla 2 cm en, 5 cm boy ve 1 mm kalınlığındaki, tip AISI 304 paslanmaz çelik plakalar Mısırlıoğlu İmal. San. ve Tic. Ltd. Şti.'de kestirilmiştir. Bu çalışmada dezenfektan olarak da farklı konsantrasyon ve etki sürelerinde CaO içerikli midye kabuğu tozu kullanılmıştır. Vegisafe® ticari ismiyle midye kabuğu

tozu, Vegi Doğal Hijyen Paz. Gıda. San. ve Tic. L.T.D. Şti., İstanbul firmasından temin edilmiştir.

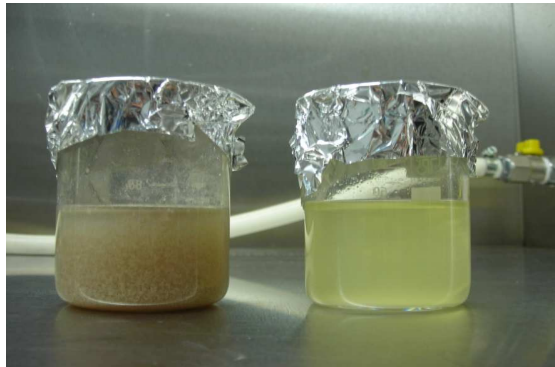
### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Bakterilerin inokulasyonu

Stok kültür halindeki *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 bakterilerinden, steril kabinde ( TEZSAN Laboratuar Tezgah San. ve Tic. Ltd. Şti.), 10 ml Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) içeren tüplere, 1'er öze dolusu aktarılmış ve *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir (Elektromag M6040BP). Aktif bakteri içeren TSB tüplerinden, tekrar 10 ml TSB tüplerine 1' er öze dolusu aktarılarak aynı işlem uygulanmış ve yaklaşık 9 log<sub>10</sub>kob/ml bakteri içeren inokulasyonlar hazırlanmıştır (Ek A1 ve 2).

#### 3.2.2. Peynir altı suyu ve et tezgahı yıkama sularının hazırlanması

Peynir altı suyu için tartım kabına dökülen 3.25 g peynir altı suyu tozu hassas terazide (AND GR 200) tartılarak behere konulur ve beher 50 ml'ye tamamlanır. Peynir altı suyu, % 6.37 kuru madde, % 0.32-0.38 protein, % 5.3-5.4 laktoz, % 0 yağ, % 0.32 kül içermektedir (Yerlikaya ve ark., 2010). Et tezgahı yıkama suyu ise, % 6.36 kuru madde, % 0.64 protein, % 1.6 yağ, % 3.86 karbonhidrat, % 0.26 kül içermektedir. Peynir altı suları ve et tezgahı yıkama suları 100 ml'lik beherlere 50' şer ml doldurulmuş ve üzeri alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra otoklavda (DAİHAN wise cleave) 121°C' de 15 dak ısıl işlem uygulanmıştır (Şekil 3.1).

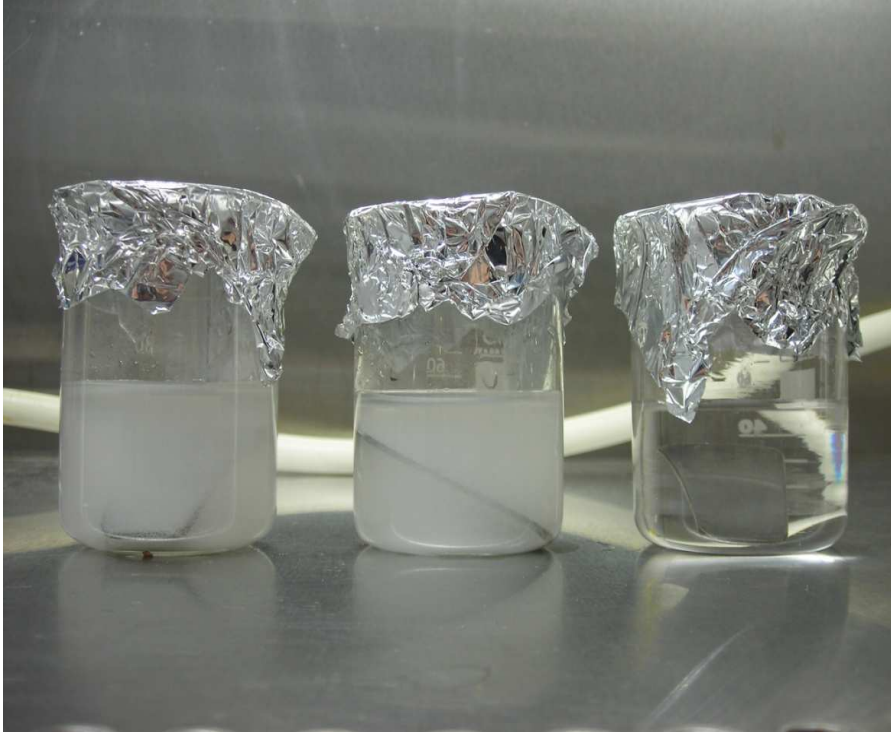


Şekil 3.1. Sterilize edilmiş tezgah yıkama suyu ve peynir altı suyu





Herbir mikroorganizma, konsantrasyon ve uygulama zamanı, tezgah yıkama suyu ve peynir altı suyunda, paslanmaz çelik plakalarda oluşmuş biyofilmler için ayrı ayrı uygulanmıştır. Her işlem 3' er tekerrürlü yapılmıştır ve bütün mikroorganizma ve işlemler için steril su ve MKT çözeltisi uygulanmamış paslanmaz çelik plakalar kontrol amacıyla ayrılmıştır. Hassas terazi ile tartım kaplarında 1.25 ve 2.5 g tartılan midye kabuğu tozu, beherlere konularak 50 ml su ile tamamlanmış ve böylece % 0.25 ve % 0.50 konsantrasyonlu MKT çözeltileri oluşturulmuştur. Su ve midye kabuğu tozunun % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu 50 ml'lik çözeltileri 100 ml'lik beherlere konularak alüminyum folyo ile kapatılmış ve manyetik karıştırıcıda 5-10 dakika karıştırılarak homojen bir çözelti oluşturulmuştur ve daha sonra oluşturulan çözeltiler ve su 121 °C' de 15 dak süre ile otoklavda sterilize edilmişlerdir. Steril kabine alınan beherlerin her birine, steril pens yardımı ile, kurutulup steril sudan geçirilen paslanmaz çelik plakalar çapraz olacak şekilde birer tane konulmuş (Şekil 3.2) ve her bir konsantrasyon için 1, 5 ve 10' ar dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.2. Paslanmaz çelik plakaların daldırıldığı steril su, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltileri

Steril su, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisi ile yıkanan paslanmaz çelik plakalar gram boyama uygulandıktan sonra 100x objektifli optik mikroskopta (Nikon Eclipse L150A) görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. Gram boyamada, plakalar kurutulduktan sonra bütün yüzeye 2 damla kristal viole damlatılmış 1 dak sonra yıkanmıştır. Yıkanan plakalara 2 damla lugol damlatılmış ve yine 1 dak sonra yıkanarak 2 damla alkol (% 96) damlatılıp 1 dak sonra tekrar yıkanmıştır. Daha sonra 2 damla safranin damlatılıp 1 dak beklettikten sonra yıkanarak kurutulmuş ve mikroskopta incelenmiştir.

### 3.2.6. Mikroorganizma izolasyonu

MKT uygulanmış ve uygulanmamış paslanmaz çelik plakalar, steril swaplarla Şekil 3.3' deki gibi silinerek swaplar 10 ml' lik steril % 0.1 peptonlu su (Merck) içerisine konularak tüp karıştırıcıda karıştırılmış ve mikroorganizmaların peptonlu suya geçmesi sağlanmıştır. Seri dilüsyonlar  $10^{-9}$ ' a kadar hazırlanmış ve hazırlanan dilüsyonlardan 0.1 ml alınarak yayma kültür yöntemi ile Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* 37 °C' de 24-48 sa inkübasyondan sonra oluşan koloniler petri kutuları kalemle işaretlenerek sayılmıştır.



Şekil 3.3. Paslanmaz çelik plakaları swaplama tekniği

Peptonlu su, % 0.1' lik et peptonundan hazırlanmış çözeltilidir. Tüplere 9'ar ml. aktarılmış ve 121°C' de 15 dak otoklavda sterilize edilerek dilüsyonlar hazırlanmıştır.

TSA besiyeri, 40.0 g/ l olacak şekilde damıtık su içinde eritilip, otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve steril petri kutularına yaklaşık 12.5' er ml dökülmüştür. Sterilizasyon sonrası 25 °C' de pH' sı  $7.3 \pm 0.2$ 'dir.

### **3.2.7. İstatistiksel değerlendirmeler**

Uygulanan MKT' nin farklı konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin etkinlik sonuçlarını karşılaştırmak için istatistik programı olarak SPSS for windows 16.0 kullanılmıştır. İstatistiksel önem  $p < 0.05$  olarak belirlenmiştir.

## BÖLÜM 4. SONUÇLAR

### 4.1. Paslanmaz Çeliğe Tutunma

Et tezgahı yıkama suyu ve peynir altı suyunda, test edilen mikroorganizmaların paslanmaz çeliğe tutunması aynı sıcaklık ve zaman aralığında gerçekleştirilse de bu iki farklı besi ortamında biyofilm oluşturmuş hücre sayıları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bütün örnekler için peynir altı suyu ve tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunma, mikroorganizmaların tutunma düzeyleri karşılaştırarak tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Peynir altı suyu ve et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücre sayıları ( $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup>)

Mikroorganizma Besi Ortamları	<i>L. monocytogenes</i> $\log_{10}$ kob/cm <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7 $\log_{10}$ kob/cm <sup>2</sup>	<i>S. aureus</i> $\log_{10}$ kob/cm <sup>2</sup>
Peynir Altı Suyu	9.43±0.93 <sup>aA</sup>	10.50±0.51 <sup>aA</sup>	9.96±0.43 <sup>aA</sup>
Tezgah Yıkama Suyu	11.07±0.60 <sup>bA</sup>	10.80±0.44 <sup>aA</sup>	10.70±0.14 <sup>bA</sup>

Ortalama ± standart sapma (n=3)

<sup>a, b</sup>: Sütunlardaki farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05)

<sup>A, B</sup>: Satırlarda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05)

*L. monocytogenes* ve *S. aureus* et tezgahı yıkama suyunda peynir altı suyuna göre daha fazla üremiş ve plakalar üzerine daha iyi tutunmuştur (p<0.05). *E. coli* O157:H7 ise et tezgahı yıkama suyu ve peynir altı suyundaki paslanmaz çelik plakalarda benzer tutunma ve çoğalma göstermiştir (p>0.05). Peynir altı suyunda en iyi tutunma 10.50  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> ile *E. coli* O157:H7 hücrelerinde görülürken en az tutunma 9.43

$\log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  ile *L. monocytogenes* hücrelerinde gözlemlenmiştir. Et tezgahı yıkama suyunda ise en iyi tutunma  $11.07 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  ile *L. monocytogenes* hücrelerinde görülürken en az tutunma  $10.70 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  ile *S.aureus* hücrelerinde gözlemlenmiştir.

#### 4.2. Midye Kabuğu Tozunun Biyofilm Temizliğine Etkisi

Peynir altı suyu ve et tezgahı yıkama suyunda geliştirilmiş ve paslanmaz çeliğe tutunmuş üç mikroorganizma için uygulanan her işlem ve işlem süresi için 3' er tekrürle çalışılmıştır (Bkz. EK B1 ve 2). Üç tekrürün ortalamaları ve standart sapmaları ile oluşturulan tablolar aşağıda verilmiştir (Tablo 4.2 ve 3).

Tablo 4.2. Midye kabuğu tozu çözeltisinin peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücrelerini temizleme etkisi ( $\log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$ )

Mikroorganizma Türleri	Uygulanan İşlemler	İşlem Süreleri (dak)		
		1	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	Yıkanmamış	$8.34 \pm 0.32^{\text{aA}}$	$9.93 \pm 0.45^{\text{aB}}$	$10.00 \pm 0.44^{\text{aB}}$
	Suyla yıkanmış	$7.63 \pm 0.28^{\text{bA}}$	$9.64 \pm 0.34^{\text{aB}}$	$9.63 \pm 0.48^{\text{aB}}$
	% 0.25 MKT	$4.85 \pm 0.18^{\text{cA}}$	$6.17 \pm 0.32^{\text{bB}}$	$6.08 \pm 0.35^{\text{bB}}$
	% 0.50 MKT	$4.53 \pm 0.03^{\text{dA}}$	$5.51 \pm 0.07^{\text{cB}}$	$5.44 \pm 0.03^{\text{cB}}$
<i>E. coli</i> O157:H7	Yıkanmamış	$11.08 \pm 0.47^{\text{aA}}$	$10.13 \pm 0.55^{\text{aA}}$	$10.28 \pm 0.56^{\text{aA}}$
	Suyla yıkanmış	$10.00 \pm 0.38^{\text{bA}}$	$9.03 \pm 0.63^{\text{aA}}$	$10.08 \pm 0.36^{\text{aA}}$
	% 0.25 MKT	$7.80 \pm 0.56^{\text{cA}}$	$6.99 \pm 0.44^{\text{bA}}$	$6.11 \pm 0.04^{\text{bA}}$
	% 0.50 MKT	$5.69 \pm 0.48^{\text{dA}}$	$4.30 \pm 0.88^{\text{cA}}$	$5.60 \pm 0.44^{\text{cA}}$
<i>S. aureus</i>	Yıkanmamış	$9.45 \pm 0.16^{\text{aA}}$	$10.18 \pm 0.68^{\text{aA}}$	$10.20 \pm 0.86^{\text{aA}}$
	Suyla yıkanmış	$8.36 \pm 0.78^{\text{bA}}$	$9.95 \pm 0.81^{\text{aA}}$	$9.77 \pm 0.68^{\text{aA}}$
	% 0.25 MKT	$5.32 \pm 0.40^{\text{cA}}$	$6.16 \pm 0.24^{\text{bA}}$	$6.13 \pm 0.32^{\text{bA}}$
	% 0.50 MKT	$4.76 \pm 0.10^{\text{dA}}$	$4.32 \pm 0.39^{\text{cA}}$	$4.53 \pm 0.26^{\text{cA}}$

Ortalama±standart sapma (n=3)

<sup>a-d</sup>: Sütunlarda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

<sup>A-C</sup>: Satırlarda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

Tablo 4.3. Midye kabuğu tozunun et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücrelerini temizleme etkisi ( $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup>)

Mikroorganizma Türleri	Uygulanan İşlemler	İşlem Süreleri (dak)		
		1	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	Yıkanmamış	11.76±0.5 <sup>aA</sup>	10.68±0.50 <sup>aA</sup>	10.76±0.48 <sup>aA</sup>
	Suyla yıkanmış	10.86±0.43 <sup>aA</sup>	9.85±0.35 <sup>aA</sup>	9.92±0.54 <sup>aA</sup>
	% 0.25 MKT	7.92±0.40 <sup>bA</sup>	6.73±0.80 <sup>bA</sup>	6.94±0.20 <sup>bA</sup>
	% 0.50 MKT	7.46±0.61 <sup>cA</sup>	5.76±0.13 <sup>cB</sup>	6.36±0.04 <sup>cC</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7	Yıkanmamış	11.29±0.37 <sup>aA</sup>	10.64±0.44 <sup>aA</sup>	10.45±0.21 <sup>aA</sup>
	Suyla yıkanmış	10.08±0.42 <sup>bA</sup>	9.89±0.38 <sup>aA</sup>	9.93±0.40 <sup>aA</sup>
	% 0.25 MKT	8.13±0.32 <sup>cA</sup>	8.03±0.58 <sup>bA</sup>	7.74±0.45 <sup>bA</sup>
	% 0.50 MKT	6.50±0.74 <sup>dA</sup>	6.60±0.70 <sup>cA</sup>	5.04±0.98 <sup>cA</sup>
<i>S. aureus</i>	Yıkanmamış	10.38±0.21 <sup>aA</sup>	10.89±0.17 <sup>aA</sup>	10.80±0.46 <sup>aA</sup>
	Suyla yıkanmış	9.56±0.30 <sup>bA</sup>	9.58±0.25 <sup>bA</sup>	9.52±0.34 <sup>bA</sup>
	% 0.25 MKT	7.83±0.27 <sup>cA</sup>	7.94±0.06 <sup>cA</sup>	7.83±0.09 <sup>cA</sup>
	% 0.50 MKT	6.99±0.43 <sup>dA</sup>	7.20±0.21 <sup>dA</sup>	7.45±0.11 <sup>dA</sup>

Ortalama±standart sapma (n=3)

<sup>a-d</sup>: Sütunlarda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

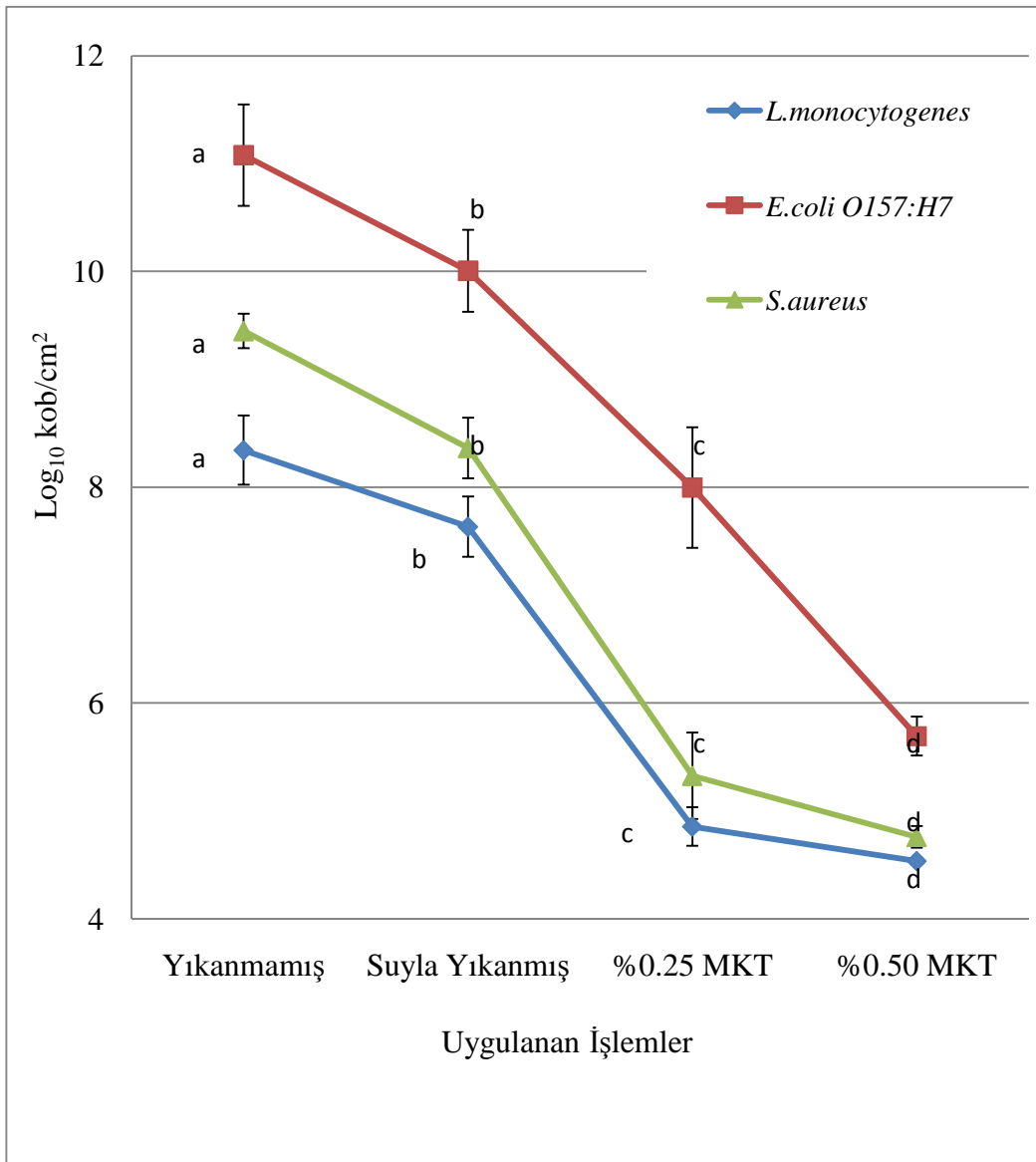
<sup>A-C</sup>: Satırlarda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

Bütün konsantrasyonlarda 1, 5 ve 10 dak olmak üzere 3 farklı temizleme işlem süresi uygulanmıştır. Bu sürelerde peynir altı suyunda geliştirilmiş patojenler için en iyi temizleme, % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin 5 dak işleminde 5.86  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> azalma ile *S.aureus* hücrelerinde meydana gelmiştir. Et tezgahı yıkama suyunda geliştirilmiş patojenler için ise en iyi temizleme, % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin 10 dak işleminde 5.40  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> azalma ile *E. coli* O157:H7 hücrelerinde oluşmuştur. Peynir altı suyunda inkübe edilmiş *L. monocytogenes* hücrelerinin paslanmaz çeliğe tutunmasında 1 dak işlem süresi, 5 ve 10 dak işlem sürelerine göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (p<0,05). Artan işlem süresi % 0.50 MKT çözeltisinin sadece et tezgahı yıkama suyunda geliştirilmiş *L.monocytogenes* biyofilmine karşı temizleme etkisi önemli derecede artmıştır (p<0,05). Ancak her mikroorganizma ve işlem süreleri için başlangıç tutunma değerleri farklı olduğundan, istatistiksel olarak oluşan farklılıklar azalmalara yansımamıştır.

Her mikroorganizma ve işlem süreleri için, midye kabuğu tozunun % 0.25 ve % 0.50 konsantrasyonlu çözeltilerinin temizleme etkisi istatistiksel olarak farklı bulunmuştur

( $p < 0.05$ ). Suyla yıkamanın paslanmaz çeliğe tutunmuş mikroorganizmalar için birçok işlem süresinde istatistiksel bakımdan etkili olmadığı gözlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

Peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş hücreler için 1 dakikalık işlem süresinde en iyi temizleme % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinde  $5.38 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  azalma ile *E. coli* O157:H7 hücrelerinde görülmüştür (Şekil 4.1).

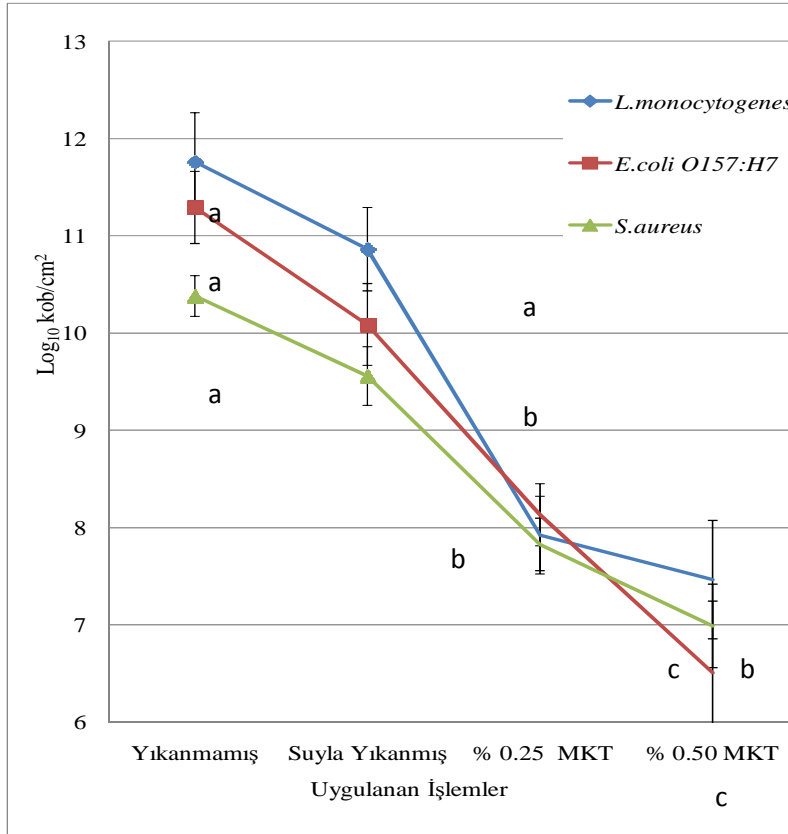


Şekil 4.1. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 1 dakikalık işleminde, peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S.aureus* hücrelerini temizleme etkisi ( $\log_{10} \text{kob/cm}^2$ )

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0.05$ )



Et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş hücreler için 1 dakikalık işlem süresinde en iyi temizleme % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinde  $4.79 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$  azalma ile *E. coli* O157:H7 hücrelerinde görülmüştür (Şekil 4.2).



c

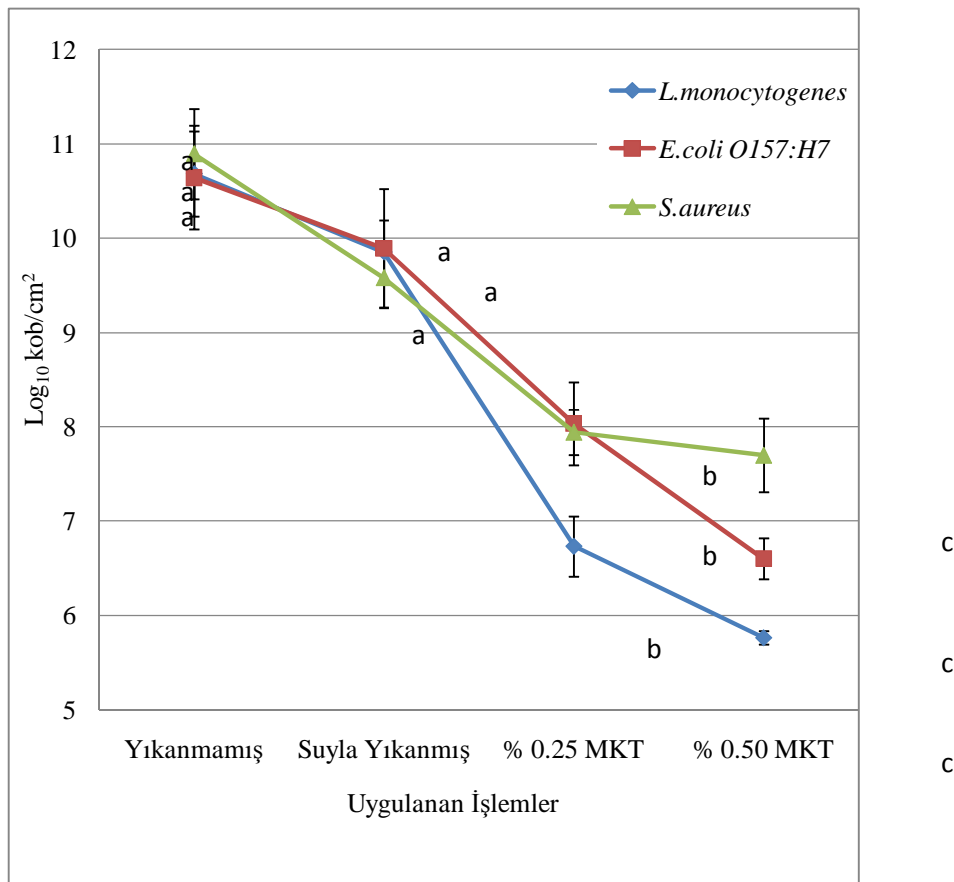
d

d

Şekil 4.2. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 1 dakikalık işleminde, et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S.aureus* hücrelerini temizleme etkisi ( $\log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$ )

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ( $p<0.05$ )

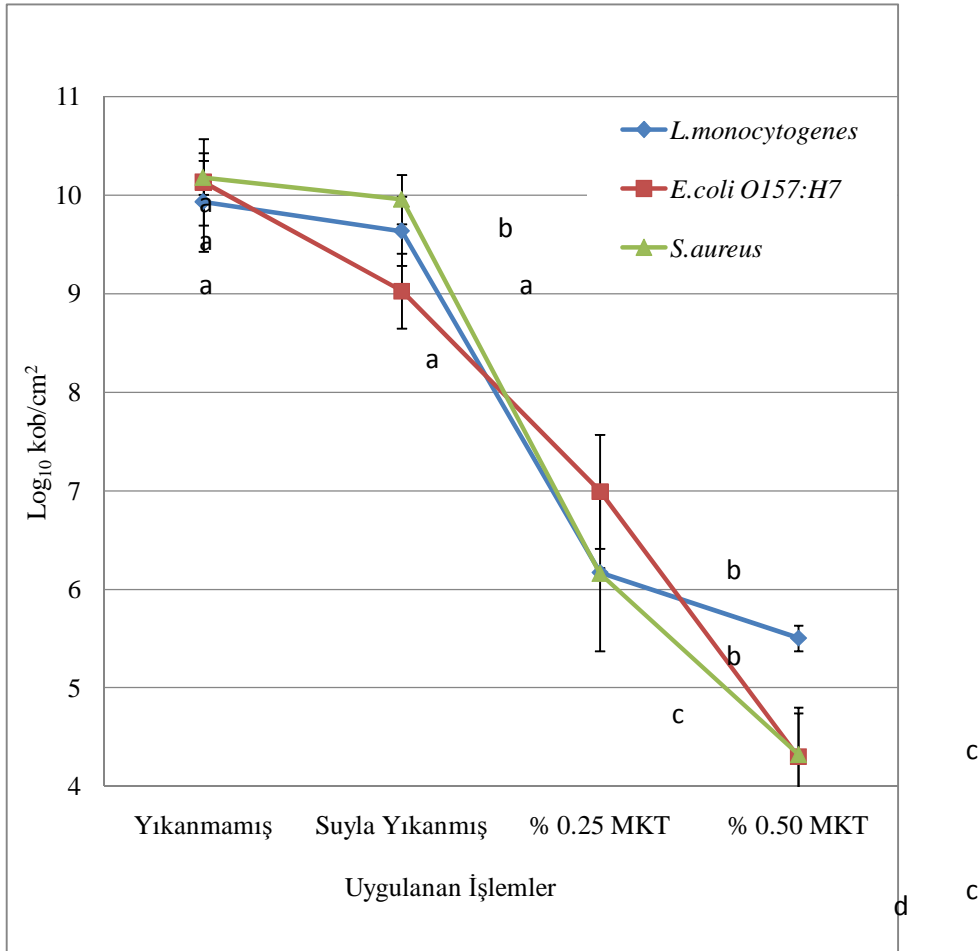
Peynir altı suyundaki paslanmaz çeliğe tutunmuş hücreler için 5 dakikalık işlem süresinde gerçekleşmiştir. En yüksek temizleme % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinde, 5.86 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> azalma ile *S.aureus* hücrelerinde görülmektedir (Şekil 4.3). *S.aureus* hücrelerini sırasıyla 5.83 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> azalma ile *E. coli* O157:H7 ve 4.37 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> azalma ile *L. monocytogenes* hücreleri takip etmektedir. Üç patojen üzerine, suyla yıkanma, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin 5 dakikalık kullanımının etkileri istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p< 0,05).



Şekil 4.3. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 5 dakikalık işleminde, peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S.aureus* hücrelerini temizleme etkisi (log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup>)

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05)

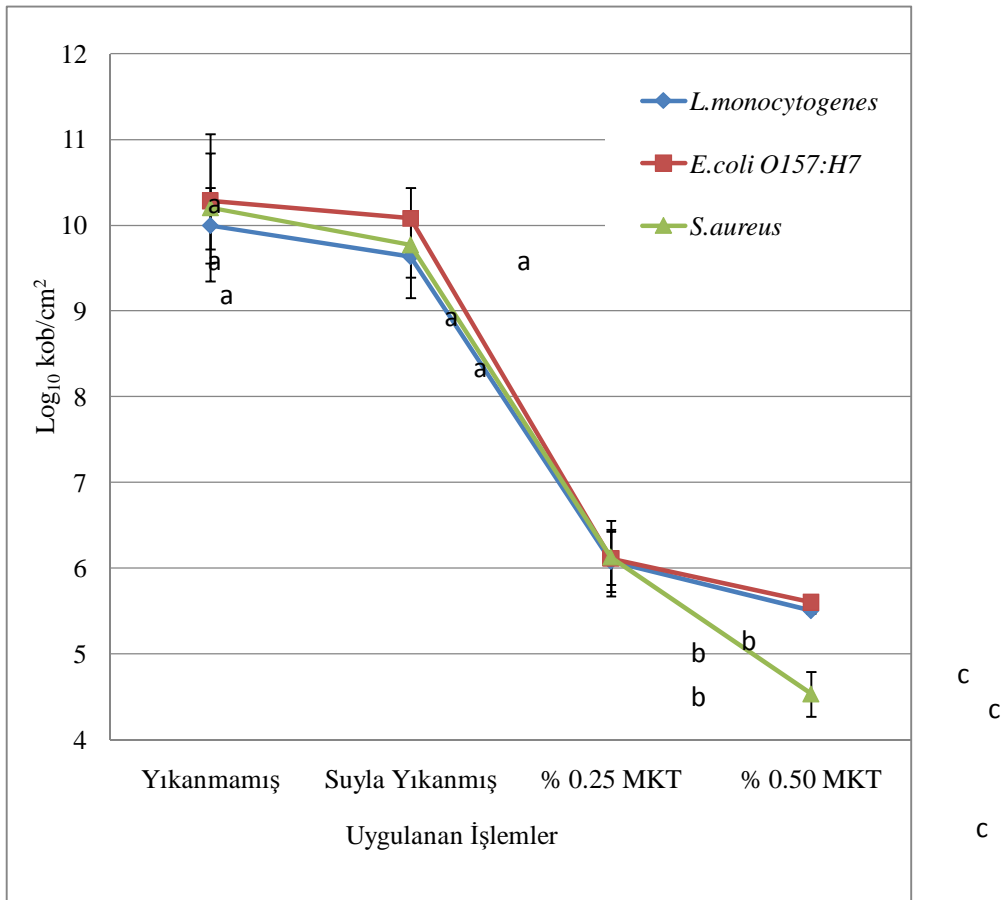
Et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş hücreler için 5 dakikalık işlem süresinde en iyi temizleme % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinde, 4.92 log<sub>10</sub> kob/ cm<sup>2</sup> azalma ile *L. monocytogenes* hücrelerinde görülmüştür (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 5 dakikalık işleminde, tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücrelerini temizleme etkisi (log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup>)

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05)

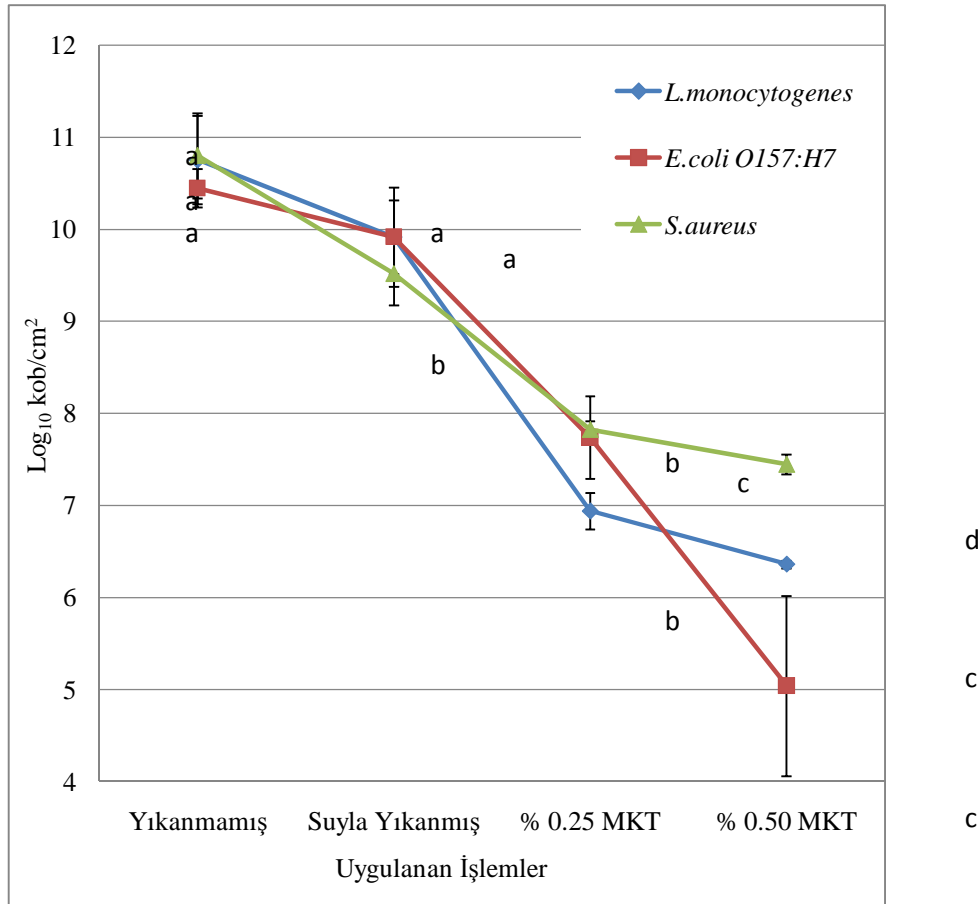
Peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *S. aureus* hücreler için 10 dakikalık işlem süresinde % 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinde, sırasıyla 4.56, 4.68 ve 5.67 log<sub>10</sub> kob/cm<sup>2</sup> azalma görülmüştür (Şekil 4.5). Üç patojen için de, suyla yıkama, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin etkileri istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05). Plakalar üzerinde oluşturulmuş biyofilm temizliğine suyla yıkamanın istatistiksel olarak etkisi bulunmamıştır (p>0.05).



Şekil 4.5. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 10 dakikalık işleminde, peynir altı suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S.aureus* hücrelerini temizleme etkisi (log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup>)

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05)

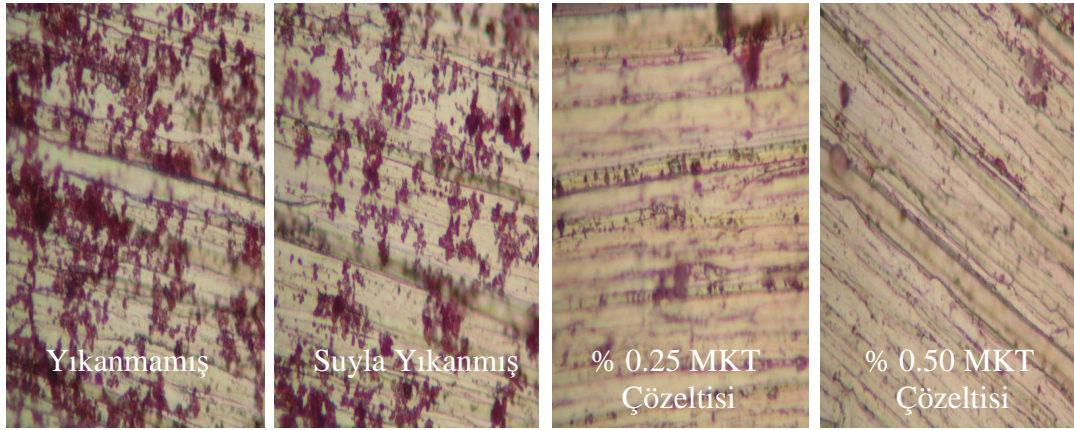
Şekil 4.6'da MKT'nin üç farklı dozda 10 dakikalık kullanımının et tezgahı yıkama suyunda çelik plaka üzerine tutunmuş *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* hücreleri üzerine etkisi gösterilmiştir. MKT çözeltisinin (% 0.50) 10 dakikalık kullanımı ile et tezgahı yıkama suyunda paslanmaz çelik üzerinde geliştirilen *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* hücre sayıları sırasıyla 4.39, 5.40 ve 3.35  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> azalma meydana getirmiştir.



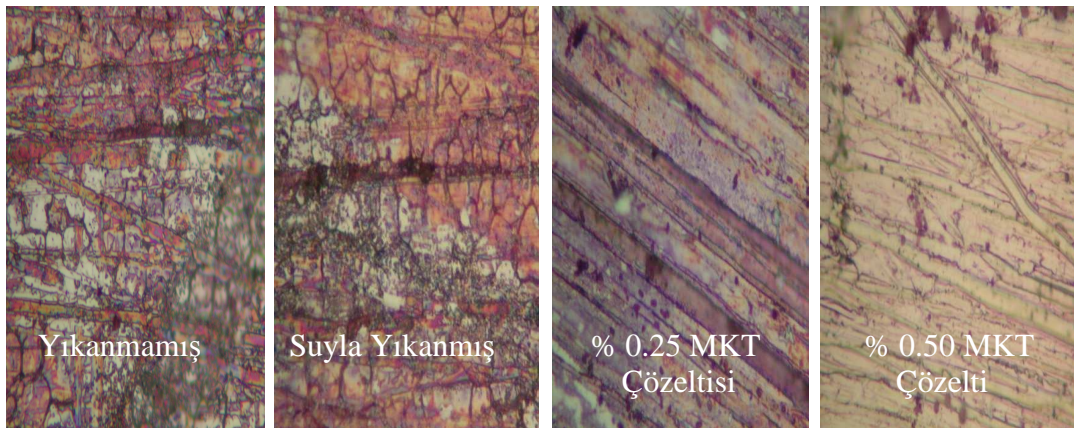
Şekil 4.6. Midye kabuğu tozu çözeltisinin 10 dakikalık işleminde, tezgah yıkama suyunda paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücrelerini temizleme etkisi ( $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup>)

a-d: Grafikte farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05)

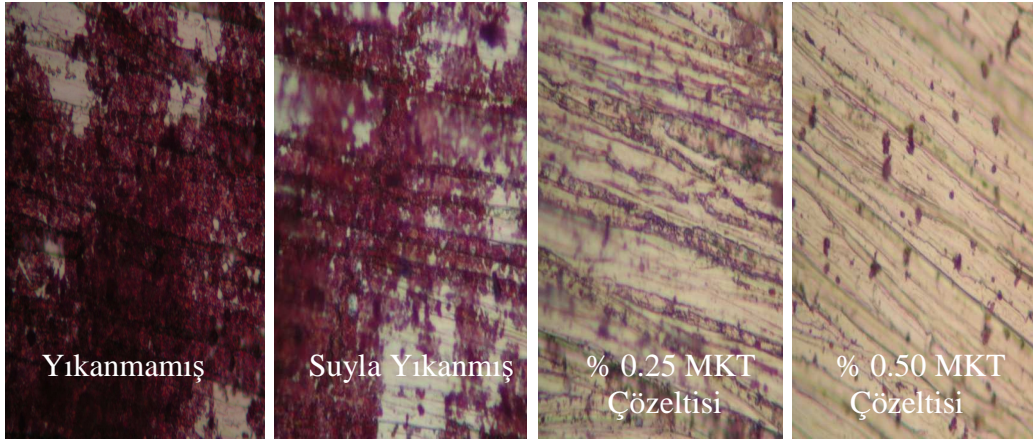
Paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, ve *S. aureus* hücrelerine işlem uygulanmadan ve steril su, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında MKT çözeltisi uygulandıktan sonra gram boyama yapılmıştır. Üç mikroorganizma için de, MKT çözeltisinin konsantrasyonu arttıkça, istatistiksel olarak paslanmaz çeliği temizleme etkisi artmış ve tutunan hücre sayılarında azalmalar meydana gelmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.7a, b ve c).



Şekil 4.7a. Yıkanmamış, suyla yıkanmış ve MKT çözeltisinin % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış *L. monocytogenes*'in gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları



Şekil 4.7.b. Yıkanmamış, suyla yıkanmış ve MKT çözeltisinin % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış *E. coli* O157:H7'in gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları



Şekil 4.7c. Yıkanmamış, suyla yıkanmış ve MKT çözeltisinin % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlarında temizleme işlemi uygulanmış *S.aureus*' un gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta çekilmiş fotoğrafları

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

### 5.1. Paslanmaz Çeliğe Tutunma

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması genelde zaman gerektiren bir süreçtir. Ancak ortama ve bakterinin kendisine bağlı olarak, gıda işleme alanlarında biyofilm oluşumu göreceli olarak daha kısa sürelerde gerçekleşmektedir (Mafu ve ark., 1990). Aynı zamanda bakteri hücre duvarının yapısına göre de (yüzey yükü, hidrofilitesi, yüzey enerjisi ve organeller) yüzeyde biyofilm oluşumu hızlanabilmektedir (Dewezve ark., 1998). Bakteri tutunması ve biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler; tutunma yüzeyi, yüzey pürüzlülük derecesi, çeşidi, alanı, sıcaklık, pH, besin içeriği, ortamın su aktivitesi, antimikrobiyel madde içeriği, oksijen ihtiyacı ve elektriksel değişkenlik, sıvının akış hızı ve zaman olarak çalışmalarda belirtilmiştir (Evans, 2000; Douglas, 2003).

Bu çalışmada, aynı şartlarda tutunma oluşturulması sağlansa da, tutunmayı birçok faktörün etkilemesi nedeniyle, tutunma düzeyleri arasında farklılıklar görülmektedir. Genel olarak tezgah yıkama suyunda üreyen bakteriler peynir altı suyunda üreyenlere göre plakalara daha iyi tutunmuşlardır. Bunun nedenleri, sıvı besi ortamlarının farklı hidrodinamikleri, öncül makromoleküler yüzey oluşumu, sıvı ortamının özellikleri ve farklı üç mikroorganizmanın test edilmesidir (Bullitt ve Makowski, 1995). Bu çalışmada, peynir altı suyunun % 0.32-0.38 protein içeriği tutunmayı arttırsa da peynir altı suyunda bulunan laktoferrin ve laktoferrisin B'nin *E. coli O157:H7*, *S. enteriditis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Camplobacter jejuni* ve *L.monocytogenes* gibi bazı mikroorganizmaların gelişimini önemli derecede engellediği ispatlanmıştır (German ve ark., 2001). Ayrıca peynir altı suyuna geçen peynir yapım aşamasında eklenebilecek tuzun mikroorganizmalardan koruyucu etkisinin olduğu bilinen bir gerçektir (Yerlikaya ve ark., 2010). Bunun yanında et tezgahı yıkama suyu kan, et



ve küçük kemik parçalarından oluşmaktadır ve % 0.64 protein, % 1.6 yağ içermektedir. Kanın mikroorganizmalar için iyi bir besi ortamı olduğu bilinmektedir (Tunçbilek ve ark., 1999). Et yağında bulunan miristik, stearik, oleik ve palmitik asitlerin biyofilm oluşumu için gerekli olduğu ve özellikle *L. monocytogenes* tutunmasına katkısı ortaya konmuştur (Boothe ve ark., 1999; Somers ve Wong, 1999; Somers ve Wong, 2001). Paslanmaz çelik yüzeye tutunarak öncül makromoleküler yüzey oluşturan et parçaları, lifli yapısı nedeniyle ideal bir yüzeydir (Schwach ve Zottola, 1982). Ayrıca tezgâh yıkama suyundaki protein miktarı (% 0.64), tutunma öncesi makromoleküler hazırlanma yüzeyi oluşturma için idealdir (Bullitt ve Makowski, 1995). Et tezgahı yıkama suyunda bulunabilecek küçük kemik parçalarının içeriğindeki prolin polipeptidi ise tutunmayı arttırmaktadır (Erler, 2001).

Tutunma düzeyleri mikroorganizma türlerine göre incelendiğinde, peynir altı suyunda üreyen gram negatif olan *E. coli* O157:H7' nin, gram pozitif olan *S. aureus* ve *L. monocytogenes*' e göre plakalara daha iyi tutunduğu gözlenmiştir. Barnes ve ark. (1999), bu mikroorganizmaların, yağsız süt varlığında paslanmaz çelik yüzeye tutunmalarında proteinlerin etkilerini araştırmışlardır. Tutunmayı en çok peynir altı suyu proteini olan alfa- laktalbüminin arttırdığı ve bu ortamda gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilere göre daha iyi tutunma gerçekleştirdiği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da, süt proteinlerin % 20' sini içeren peynir altı suyunda aynı sonuçlar kaydedilmiştir. İstatistiksel olarak önemli bir fark bulunmasada test edilen patojenler tezgâh yıkama suyunda plakaya tutunmuş hücre sayılarına göre *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* şeklinde sıralanmışlardır. *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 hareketli bakteriler olup flagellaları ile tutunma sağlayabileceği, *S. aureus* ise hareketsiz olup biyofilm bağlantılı protein yardımı ile biyofilm oluşturduğu (Bap=biyofilm-associated protein) bilinmektedir (Davey ve O'Toole 2000; Vatanyoopaisarn ve ark., 2000; Latasa ve ark., 2006). Bu bilgi doğrultusunda, bu çalışmada *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7' nin *S. aureus*' dan neden daha iyi biyofilm oluşturduğu açıklanabilir.

Biyofilm oluşumunda en önemli nokta, mikroorganizmaların tutunmasına uygun yüzeylerin seçilmesidir. Daha az kirliliğe eğilimli paslanmaz çelik yüzey üretmek için oluşturulan Avrupa Modsteel Projesi kapsamında biyofilm oluşumuna dirençli

bazı malzemeler geliştirilmiştir (Zhao, 2004; Brooks ve Flints, 2008). Bakteriyel tutunmayı % 82-97 oranında azaltan yüzey üretmek için antimikrobiyel kaplama teknikleri geliştirilmiştir. 316L paslanmaz çelik üzerine bu teknikle oluşturulan Ag-PTFE kompozit kaplama antimikrobiyel ve antikorozyif özellik göstermiştir. Kaplanan yüzeyin serbest yüzey enerjisi 24.52 mN/m olduğunda, *E. coli* tutunmasında, kaplanmamış 316L paslanmaz çelikte ve titanyum levhasında görülen tutunmayla karşılaştırıldığında yaklaşık 2 logaritmik birim azalma görülmüştür.

Benzer olarak, paslanmaz çeliğin dışında, düşük yoğunlukta bir polietilen olan etilen vinil asetat polimerine düşük çözünürlükte ticari dördü amino bileşiği uygulanarak yapılan yüzeyde, kontrol polimeri ile karşılaştırıldığında *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella* suşlarının varlığını sürdürmesi ve tutunması büyük ölçüde azalmıştır (Ölmez, 2009).

Gıda işleme ekipmanlarının oluşturulmasında antimikrobiyel materyallerin eklenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, kesme tahtası, duvarlar veya zemin materyali gibi gıda ile temas eden yüzeylere güçlü bir antimikrobiyel olan triklosan eklendiği zaman yağ asidi biyosentezinde rol alan enoyl-acyl taşıyıcı protein redüktaz enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Hartog, 2004). Ancak, gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel bir yüzey sağlamadığı durumda bu bakterilerin triklosan ve diğer antimikrobiyellere karşı direnç kazanabileceği kaygısı mevcuttur. Gerçekte *Pseudomonas* için seçici kültür agarına triklosan eklenebilmektedir, fakat gıda katkı maddesi olarak eklenmesi yasaklandığından dolayı gıdaya geçebilme ihtimaline karşılık kural dışıdır ve istenilmemektedir (Ölmez, 2009).

Gıda işletmelerinin büyük kısmında sonu olmayan boruların, çatlak ve çizik yüzeylerin, temizlik ve dezenfektanların ulaşamadığı kör noktaların ve gıda atıklarının varlığının bulunduğu gerçeği göz önüne alındığında, biyofilm oluşum sürecini engellemenin en iyi ve en kolay yolu, biyofilm gelişimine uygun olan yüzeylerin azaltılması ya da kullanılmamasıdır. Bu çalışmada kullanılan paslanmaz çelik, gıda işletmelerindeki temizlik açısından en uygun yüzeydir (Maukonen ve ark., 2003). Ancak bu yüzeyde bile et tezgahı yıkama suyu ve peynir altı suyu varlığında tutunma meydana gelmiştir. Bu nedenle doğru konsantrasyon ve sıcaklıklarda uygun

dezenfektanlar kullanılarak, mikroorganizmaların biyofilm oluşturmasını arttıran, yzeylerde kalan gıda atıklarının oluşturduğu öncül makromoleküler yzey oluşumu da yok edilmeli ya da en aza indirgenmelidir.

## 5.2. Midye Kabuğu Tozunun Biyofilm Temizleme Etkisi ve Biyofilm Kontrolü

Dezenfektan, antiseptik ve koruyucu ürünler gibi biositlerdeki bileşenin aktivitesini birçok faktör etkilemektedir. Mikroorganizma çeşidi, besi ortamının içeriği ve özellikleri, dezenfektan uygulama sıcaklığı, dezenfektanın uygulama süresi ve konsantrasyonu en önemli faktörler olarak sayılmaktadır (Holah, 1995). Bu çalışmada, bütün mikroorganizmalar için, besi ortamı ve uygulama sürelerinde, konsantrasyon arttıkça MKT çözeltisinin biyofilm temizleme etkisinin istatistiksel bakımdan önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Nitekim, MKT çözeltisi ile yapılan diğer çalışmalarda da, konsantrasyon artırıldığında, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ve *S. Typhimurium*'a karşı bakterisidal aktivitenin arttığı tespit edilmiştir (Sawaii ve ark., 2001a; Bae ve ark., 2006; Çağrı-Mehmetoğlu ve Yaldırak, 2009; Bodur ve ark., 2010). Ancak MKT çözeltisi ile yapılan birçok çalışmada uygulama süresinin artması mikroorganizma hücre sayılarında azalmaları etkilememiştir (Sawaii ve ark., 2001a; Çağrı-Mehmetoğlu ve Yaldırak, 2009; Bodur ve ark., 2010). Bu çalışmada da, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* biyofilmlerinin temizliğinde MKT çözeltisi 1 dak gibi kısa bir sürede etkili sonuç vermiştir ve MKT çözeltisinin 1, 5 ve 10 dak işlem sürelerinde uygulanmasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir ( $p > 0.05$ ). Bunun yanı sıra, işlem süresinin artışı *L. monocytogenes* biyofilmini plakalardan temizlenmesini attırmıştır ( $p < 0.05$ ). (Tablo 4.2 ve 3)

Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7 hücreleri için, 10 dak işlemden sonra en iyi temizleme, % 0.50 konsantrasyonlu MKT çözeltisinde,  $4.68 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  iken, *L. monocytogenes* hücreleri için aynı konsantrasyonda  $4.66 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  dir. Yapılan diğer çalışmalarda ise aynı işlem süresinde, daha az konsantrasyonlarda bile (% 0.10), sosiste, *E. coli* O157:H7 hücreleri için  $5.9 \log_{10} \text{kob/g}$  azalma (Bodur ve ark., 2010) ve tavuk derisinde, *L. monocytogenes* hücreleri için  $6 \log_{10} \text{kob/g}$  azalma gözlenmiştir (Çağrı-Mehmetoğlu ve Yaldırak, 2009). Ancak, işlem süreleri aynı olsa

da, diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada MKT'nin biyofilm temizlenme etkisinin araştırıldığı unutulmamalıdır. Nitekim, biyofilm yapısındaki hücrelerin dezenfektanlara karşı direncinin sıvı süspansiyon haldeki hücrelerin direncinden çok daha fazla olduğu bilinmektedir (Krysinski ve ark., 1992; Costerton ve ark., 1994b). Bu durum, dezenfektan maddelerin biyofilm yapısından difüzyonları nedeniyle film yapısında hiçbir zaman gerekli derişimlere ulaşamamalarından kaynaklanmaktadır. Bununla beraber film yapıya gömülü olarak yaşayan bakteriler serbest olarak bulunan bakterilere göre daha az oksijen ve besin kullanmaktadır (Anwar ve ark., 1992). Bu bazı durumlarda hücre fizyolojisinde büyük değişikliklere neden olabilir. Bu durumdaki bakterilerin çoğalma hızı oldukça yavaşlamakta, bu nedenle kimyasallara karşı olan direncin arttığı düşünölmektedir. Biyofilm yapısındaki bakterilerinin bu tanımlanan durumda antibiyotikler, surfektanlar ve diğer zehirli maddelere karşı olan hassasiyeti belirgin bir şekilde azalmaktadır (Bower ve ark., 1996).

Mikroorganizma türü de dezenfektan etkinliğini değiştiren faktörlerden bir diğeridir (Holah, 1995). Steril sudan sonra (% 0.0 MKT çözeltisi), en az temizleme % 0.25 konsantrasyonlu MKT çözeltisinin olduğu 1 dak işleminde  $2.56 \log_{10} \text{kob/cm}^2$  ile et tezgahı yıkama suyunda gelişen *S. aureus* hücrelerinde görölmüştür. Bu konsantrasyonda, *S. aureus*, *E.coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'ten daha dirençlidir. Nitekim, bazı araştırmacılar *S. aureus*' un KAB, klor, aldehytler, peroksiasetik asit, hidrojen peroksit gibi birçok dezenfektana karşı oldukça dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır (Van de Weyer ve ark., 1993; Frank ve Chmielewski, 1997) Örneğin, bazı *Staphylococcus* türlerinin KAB'lara karşı direnç sağlayan genleri kodlama yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir (Sundheim ve ark., 1998; Grönholm ve ark., 1999). *Staphylococcus* türlerinde bulunan enzim sistemlerinin ise hidrojen peroksidi inaktive ettiği belirtilmiştir (Sander ve Wilson, 1999). *E. coli* O157:H7 ve *Listeria spp.*'nin ise bu dezenfektanlara karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir (Yu ve ark., 2001; Park ve ark., 2004). Bakterilerin dezenfektanlara karşı hassasiyetini besiyeri de etkileyebilmektedir. Sıvı besi ortamlarının farklı hidrodinamikleri, öncül makromoleküler yüzey oluşumu, sıvı besi ortamının özellikleri tutunmayı etkilediği gibi (Bullitt ve Makowski, 1995), dezenfektanın bakterisidal etkilerini de değiştirmektedir (Holah, 1995). Yapılan çalışmalarda, besi

ortamının protein seviyesinin artmasının dezenfektanların bakterisidal etkilerini düşürdüğü kanıtlanmıştır (Van de Weyer ve ark., 1993; Mullerat ve ark., 1995). Dezenfektanlar yüzey tarafından emilerek ya da yüzeye reaksiyona girerek inaktif olmuşlardır (Holah, 1995).

Bu çalışmada MKT çözeltisinin % 0.25 ve % 0.50 konsantrasyonlarda pH'sının 12'den fazla olduğu bulunmuştur, Bu nedenle kuvvetli alkaliteye sahip olan MKT çözeltisinin antimikrobiyel etkisinin, içeriğindeki hidroksit iyonunun (OH<sup>-</sup>) hücre duvarını aşarak hücreyi hidroliz etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hısao ve Hiroyuki, 1999). Bu çalışmada % 0.5 konsantrasyonlu MKT çözeltisi paslanmaz çeliğe tutunmuş hücrelerde 5 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup>, tan fazla azalma sağlanmıştır. Başka bir çalışmada ise yaklaşık 6 log<sub>10</sub>kob/ml *E. coli O157:H7* ve *P. aeruginosa* hücrelerine, % 0.5 konsantrasyonlu MKT çözeltisi ve sodyum hidroksit (NaOH) uygulanmıştır. Bu durumda, MKT çözeltisinin pH' sı 11.8, NaOH çözeltisinin pH' sı 12 olduğu ve iki çözeltinin de *E. coli O157:H7* ve *P. aeruginosa* hücrelerini yok ettiği görülmüştür (Hısao ve Hiroyuki, 1999). Ayrıca, alkali çözeltiler, yüzeylerdeki karbonhidrat, yağ ve proteinlerin temizlenmesinde oldukça etkilidir (Kresse, 1989). Bu nedenle bu çalışmada MKT çözeltisinin, biyofilm oluşumunu arttıran, öncül makromoleküler yüzey oluşturan karbonhidrat, yağ ve proteini yok ederek biyofilm oluşumunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır.

MKT çözeltisinin test edilen patojenlerin oluşturduğu biyofilm temizliğinde, diğer araştırmacıların test ettiği klor, peroksit veya perasetik asit içeren dezenfektanlarla benzer etki ya da bu dezenfektanlardan daha iyi temizleme etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Ryu ve ark., 2004; Gram ve ark., 2007). Örneğin, bu çalışmada MKT'nin % 0.50 konsantrasyonlu (1 dak) çözeltisinde paslanmaz çeliğe tutunan *E. coli O157:H7* hücrelerinde 5.39 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada ise 200 µg/ml klorin *E. coli O157:H7*'nin paslanmaz çelik plakalarda oluşturduğu biyofilmi 1 dakikada yaklaşık 5.5 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> azaltmıştır (Ryu ve ark., 2004). Yine bu çalışmada, % 0.50 konsantrasyonlu MKT çözeltisi 5 ve 10 dak işlem süreleri uygulandığında, *L. monocytogenes* hücrelerinde 4 log<sub>10</sub>kob/cm<sup>2</sup> üzerinde azalmalar gösterirken, Gram ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada ise % 1 gibi daha yüksek konsantrasyonlu perasetik asit ve hidrojen peroksit içeren

dezenfektan 15 dak gibi daha uzun bir süre uygulandığında bile, et emülsiyonunda gelişmiş ve paslanmaz çeliğe tutunmuş *L. monocytogenes* hücrelerini sadece 2  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> azaltmıştır (Gram ve ark., 2007). Bu çalışmada, MKT'nin 5 dakikalık işlem süresi ile 5.86  $\log_{10}$ kob/cm<sup>2</sup> *S.aureus* hücrelerini paslanmaz çelik plakanın yüzeyinden yıkamış olmasına rağmen, paslanmaz çeliğe tutunmuş *S. aureus* hücrelerini 100 ve 200 mg/l hipokloritin 10 dak' da sadece 4  $\log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup>, 250 mg/l perasetik asitin ise sadece 2  $\log_{10}$  kob/cm<sup>2</sup> azalttığı kaydedilmiştir (Rossoni ve Gaylarde, 2000).

MKT çözeltisinin bu kimyasal maddelerle benzer temizleme etki yada bu maddelerden daha iyi temizleme etkisi gösterdiği çalışmalarla desteklenmiştir. Ayrıca gıda işletmelerinde kullanılan kimyasal maddeler fiyat ve rahatlık açısından cazip gelse de bir çok işletme toksisite ve güvenlik açısından bu kimyasallardan sakınmaktadır (Jin ve ark., 1995). Nitekim, son durulamanın yetersiz yapılması ve deterjan, dezenfektan kalıntılarının ekipman yüzeylerine absorpsiyonu nedenleri ile kimyasal maddelerin gıdalara bulaşması mümkündür. Örneğin, lastik contalara iyodoforların absorpsiyonu ile süte iyot bileşikleri bulaşabilmektedir (Mannaert, 1979; Palmer 1991; Dornseiffen, 1998; Maris, 1998). Benzer şekilde KAB'ın absorbe olması ve özensiz yapılan durulama ile gıdada 0.69 mg/l düzeyinde kalıntının kaldığı kanıtlanmıştır (Dunsmore ve ark., 1978).

Yapılan araştırmalarda bulunan dezenfektan madde kalıntılarının miktarları genellikle 2 ppm' den daha azdır. Bu düzey toksik ya da öldürücü doz olarak belirtilen 0.5–3.0 g/l'nin oldukça altında bulunduğundan düşük düzeyde kimyasal kalıntı içeren gıdaların tüketimi insanlar için genellikle zehirlenme riski taşımamaktadır. Ancak yine de söz konusu maddeleri düşük seviyelerde içeren gıdaların tüketiminin uzun dönemde etkisinin ne olacağı tam olarak bilinmemektedir (Karagözlü ve Karagözlü, 2004). Örneğin iyodürün tirotoksikose etkisi ortaya çıkmıştır. Hidrojen peroksit kalıntılarının ise farelerde on iki parmak bağırsak kanserine yol açtığı belirlenmiştir (Toyoda ve ark., 1982).

Bu kimyasal maddeler, toksisite ve sağlık açısından sıkıntılar yarattığı gibi paslanmaz çelik ve diğer metaller üzerinde klor, iyot ve peroksit ve perasetik asitler

yüksek korozif etkilere sahiptirler (Marriott, 1989; Hayes, 1992; Reuter, 1998; Sander ve Wilson, 1999). Ayrıca peroksitler ve perasetik asitler, proteinlerle reaksiyona girerek istenmeyen ürünlerin ortaya çıkmasına ve üründe renk değişikliklerine neden olabilmektedirler (Hayes, 1992; Temiz, 2001).

Yapılan çalışmalarda, gıda işletmelerinde sıklıkla kullanılan kimyasallar gerek metal ve gıdada sebep olduğu değişimler gerekse kalıntılarının insan sağlığına verebileceği zararlar açıkça gösterilmektedir (Karagözlü ve Karagözlü, 2004). Bu nedenlerle doğal dezenfektanlara talep gün geçtikçe artmaktadır. Midye kabuğu çözültisi doğal bir dezenfektan olmasının yanında, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. marcescens*, *E. faecalis*, *S. mutants*, *Legionella spp.*, *Campylobacter spp.* üzerinde üremeyi durdurucu etkisi bir çok çalışmada belirlenmiştir (Hısao ve Hiroyuki, 1999; Sawai ve ark., 2001a ve b; Yaldirak ve Çağrı-Mehmetoğlu, 2009; Bodur ve ark., 2010). Bunun yanında raf ömrünü arttırdığı ve bazı zirai ilaç ve hormonların temizlenmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Kim ve ark., 2007; Choi ve ark., 2006; Hısao ve Hiroyuki, 1999). Ayrıca gıdaların duyuşal özelliklerini de değiştirmemektedir. Bodur ve ark. (2010)' nın yaptığı bir çalışmada, % 0.05 ve % 0.1 konsantrasyonlu MKT çözültisinin sosislerin duyuşal özelliklerini değiştirmediği bildirilmiştir. Bu araştırma göstermiştirki, doğal bir dezenfektan olan midye kabuğu tozu serbest hücreleri temizleme etkisinin yanında paslanmaz çeliğe tutunmuş *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* hücrelerini de büyük ölçüde temizleme etkisine sahiptir. Midye kabuğu tozu, farklı çalışmalarda ortaya çıkan üstün özellikleri ve yüksek oranda biyofilm temizleme özellikleri nedeniyle kimyasallara alternatif, sağlığı zararsız doğal bir dezenfektan olarak işletmelerde kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

AARNISALO, K., SALO, S., MIETTINEN, H., SUIHKO, M. L., WIRTANEN, G. and AUTIO, T., Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20, 237–250, 2000.

AASE, B., SUNDHEIM G., LANGSRUD, S. and RORVIK, L., Occurrence of and possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 57-63, 2000.

AHMER, B.M.M., Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 52, 933-945, 2004.

ALLISON, D.G., The biofilm matrix. *Biofouling*, 19, 2, 139-150, 2003.

ANWAR, H., STRAP, J.L. and COSTERTON, J.W., Eradication of biofilm cell of *Staphylococcus aureus* with tobramycin, cephalexin, *Can. Journal of Microbiology* 38,618-625, 1992.

APPLEGATE, D.H. and BRYERS, J.D., Effects of carbon and oxygen limitation and calcium concentrations on biofilm recovery processes. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 17–25, 1991.

ARDA, M., Temel mikrobiyoloji, İkinci baskı, Medisan Yayın Serisi No 25., 80-103, 1997.

ARNOLD, J.W. and SILVERS, S., Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79, 1215-1221, 2000.

BAE D.H., YEON, J.H., PARK, S.Y., LEE, D.H. and HA, S.D., Bactericidal Effects of CaO (Scallop-Shell Powder) on Foodborne Pathogenic Bacteria. *Archives Pharmacal Research* 29, 298-301, 2006.

BAGGE-RAVN, D., NG, Y., HJELM, M., CHRISTIANSEN, J.N., JOHANSEN, C. and GRAM, L., “The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection”, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 239-50, 2003.



BAIRD-PARKER, T.C., The production of microbiologically safe and stable foods. In: Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould (eds.) The Microbiological Safety and Quality of Foods. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA., 3-18, 2000.

BANATVALA, N., MAGNANO, A.R., CARTTER, M.L., BARRETT, T.J., BIBB, W.F., VASILE, L.L., MSHAR, P., LAMBERT-FAÏR, M.A., GREEN, J.H., BEAN, N.H. and TAUXE, R.V., Meat grinders and molecular epidemiology: two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of Infectious Diseases*, 173, 480–483, 1996.

BANKS, M.K. and BRYERS, J.D., Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl Environment Microbiol* 57, 1974-1979, 1991.

BARNES, L.M, LO, M.F., ADAMS, M.R. and CHAMBERLAIN, A.H., Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 65, 10, 4543-4548, 1999.

BARRON, W., Disinfection and disinfectant. *J. Dair. Sci.* 53(7),30, 1988.

BERGDOLL, M.S., *Staphylococcus aureus*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74, 706-710, 1991.

BODUR, T., YALDIRAK, G., KOLA, O. and ÇAĞRI-MEHMETOĞLU, A., Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on Frankfurters Using Scallop-Shell Powder. *Food Safety*, 30, 3, 740-742, 2010.

BOOTHE, D.D.H., ARNOLD, J.W. and CHEW, V., Utilization of substrates by bacterial communities as they develop on stored chicken meat samples. *Poultry Sci.* 78,1801-1809, 1999.

BOWER, C.K., MCGUIRE, J. and DAESCHEL, M.A., The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces, *Trends in Food Science and Technology*, 7, 152-157, 1996.

BROCK, T.D., (2003). Great Events in Microbiology: Significant Events of the Last 125 Years. [www.scientifichistory.com](http://www.scientifichistory.com), erişim tarihi: 08.04.2010.

BROOKS, J.D. and FLINTS, S.H., Biofilms in The Food Industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2163-2176, 2008.

BRYAN, L.F., Public health aspects of cream-filled pastries. A review. *J. Milk Food Technol.* 39, 289-296, 1976.

BULLITT, R. and MAKOWSKI, L., Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature.* 373,164-167, 1995.

CALAZANS, G. M.T., LOPES, C.E. and LIMA, R.M., O. C., de Franc FP. Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains, *Biotechnol Lett*, 19, 19-21, 1997.

CARPENTER, B. and ERF, O., Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 499–511, 1993.

CARPENTER, B. and CHASSAING, D., “Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises”, *International Journal of Food Microbiology*, 97, 111-122, 2004.

CHAPMAN, P.A., SIDONS, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P., FOX, J. and CRICK, E., Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect.* Dec; 111(3), 439–447, 1993.

CHARLTON, B.R., KINDE, H. and JENSEN, L.H., Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. *J Food Prot* 53(3),198-201, 1990.

CHECHOWSKI, M.H., Bacterial attachment to Buna-N gaskets in milk processing equipment. *J.Dairy Technol.* 45,113-114, 1990.

CHMIELEWSKI, R.A.N. and FRANK, J.V., Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 21-32, 2003.

CLIVER, DO., Foodborne Disease. In: Doyle Mp, Cliver Do, eds. *Escherichia coli*. Academic Press, Inc., San Diego, California. 92101, 209-215, 1990.

CLOETE, T.E., Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Bio-degrad* 51, 277– 282, 2003.

CHOI, Y.M., WHANG, J.H., KIM, J.M. and SUH, H.J., The effect of oyster shell powder on the extension of the shelf-life of Kimchi. *Food Control*, 17, 695–699, 2006.

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. and CHENG, K.J., How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95, 1978.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C. and DASGUPTA, M., Bacterial Biofilms in Nature and Disease, *Annu Rev Microbiol.*, 41, 435-64, 1987.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R. and LAPPIN-SCOTT, H.M., Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D. and JAMES, G., Biofilms the Customized Microniche, *J. Bacteriol.* 176, 2137- 2142,1994a.

COSTERTON, J.W., ELLIS, B., LAM, K., JOHNSON, F. and KHOURY, A.E., Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria, *Antimicrob Agents Chmother.* 3881, 2803-2809, 1994b.

COX, L.J., KLEISS, T., CORDIER, J.L., CORDELLANA, C., KONKEL, P., PEDRAZZINI, C., BEUMER, R. and SIEBENGA, A., *Listeria* spp. in food processing, nonfood and domestic environments. *Food Microbiol*, 6,49-61, 1989.

ÇAĞRI-MEHMETOĞLU, A. and YALDIRAK, G., "The Effect of Surfcer® Treatment on the Growth of *Salmonella enteritidis* on chicken skin" 3<sup>rd</sup> International Congress on Food and nutrition, Program and Abstract Book, 6, 101-102, Antalya, Turkiye, 2009.

DAVEY, M.E. and O'TOOLE, G.A., Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847-867, 2000.

DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W. and GREENBERG, E.P., The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.*280:295-298, 1998.

DAVISON, J., Genetic exchange between bacteria and environment., *Plasmid.*, 42, 73-91, 1999.

DEWEZ, L.J., LHOEST, B.J., DETRAÏT, E., BERGER, V., GILLIAN, D.C.C., VINCENT, M.L., SCHNEIDER, J.Y., BERTRAND, P. and ROUXHET, P.G., Adhesion of mammalian cell to polymer surfaces from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns, *Biomaterials*, 19, 1441-1445, 1998.

DONABEDIAN, H., Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*; 46, 207-214, 2003.

DONLAN, R.M. and COSTERTON, J.W., Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2), 167-193, 2002.

DONLAN, R.M., Biofilms and device associated infections. *Emerg Infect Dis.* 7,277-281, 2001.

DONLAN, R.M., Biofilms:Microbial life on surfaces. *Emerg.Inf.Disease.*,8,881-890, 2002.

DORNSEIFFEN, J.W., Residue aspects of disinfectants used in the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 309-312, 1998.

DOUGLAS, L.J., *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol.* 11,30-36, 2003.

DUNSMORE, D.G., STANNARD, D.J. and HEYES, I.H., Quaternary ammonium compound sanitizers in milk. N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 13, 49-53, 1978.

DUNSMORE, D.G., TWOMEY, W., WHITTLESTONE, G. and MORGAN, H.W., Design and performance of systems for cleaning products contact surfaces of food equipment. J. Food Prot. 44, 220-240, 1981.

HECKER, C. and LENZ, W., Enterotoxinnachweis und Lysotypie bei *Staphylococcus aureus* in Rahmen der Speiseüberwachung. Arch. F. r Lebensmittelhyg. 41, 120-126, 1990.

EHLERS, L.J. and BOUWER, E.J. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. Water Sci. Technol., 7, 163-171, 1999.

ERLER, K., Hastane infeksiyonları, GATA Basımevi-Ankara, 230-236, 2001.

EVANS, L.V., Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control, Singapore, Harwood, Academic Publisher, 2000.

FITZGERALD, K.A., DAVIES, A. and RUSSELL, A.D., Sensitivity and resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to chlorhexidine. Lett. Appl. Microbiol., 14, 33-36, 1993.

FLETCHER, M., LESSMAN, J.M. and LOEB, G.I., Bacterial surface adhesives and biofilm matrix polymers of marine and freshwater bacteria. Biofouling, 4, 129-140, 1991.

FRANCKE, A.A., BRUHN, J.C. and OSLAND, R.B., Factors affecting iodine concentration of milk of individual cows. Journal of Dairy Science, 66, 997-1002, 1993.

FRANK, J.F. and CHMIELEWSKI, R.A.N., Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. Journal of Food Protection, 60, 43-47, 1997.

FRANK, J.F., Microbial attachment to food and food contact surfaces. Advances in Food and Nutrition Research, 43, 319-370, 2000.

FRANK, J.F. and KOFFI, R.A., Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. J. Food Prot. 53, 550-554, 1990.

FUJISHIGE, N.A., KAPADIA, N.N. and HIRSCH, A.M., A feeling for the microorganism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. Bot J Linnean Soc, 150 (1), 79-88, 2006.

- FURUKAWA, S., AKIYOSHI, Y., KOMORIYA, M., OGIHARA, H. and MORINAGA, Y., Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Biofilms on Stainless Steel by Cleaning-in-Place (CIP) Cleaning Agents. *Food Control*, 21, 669–672, 2010.
- GANDHI, M. and CHIKINDAS, M. L., *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15, 2007.
- GERMAN, J.B., DILLARD, C.J. and WALZEM., R.L., *Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review*. May 2000. U.S. Dairy Export. Council., 2001.
- GHIGO, J.M., Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 412:442-445, 2001.
- GIBSON, H., TAYLOR, J.H., HALL, K.E. and HOLAH, J.T., *Biofilms and Their Detection in the Food Industry*, CCFRA R&D Report No.1.CCFRA, UK, Chipping Campden, 1995.
- GIBSON, H., TAYLOR, J.H., HALL, K.E. and HOLAH, J. T., Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms, *Journal of Applied Microbiology*, 87, 41-48, 1999.
- GIESE, J., Sanitation: the key to food safety and public health. *Food Technology*, 45(12),74-80, 1991.
- GOUNADAKI, A.S., SKANDAMIS, P.N., DROSINOS, E.H. and NYCHAS, G-J.E., Microbial Ecology of Food Contact Surfaces and Products of Small-Scale Facilities Producing Traditional Sausages. *Food Microbiology*, 25, 313–323, 2008.
- GRAM, L., BAGGE-RAVN, D., NG, Y. Y., GYMOESE, P. and VOGEL, B. F., Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1165–1171, 2007.
- GRÖNHOLM, L., WIRTANEN, G., AHLGREN, K., NORDSTRÖM, K. and SJÖBERG, A., Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch A*, 208,289-298, 1999.
- GUDBJO'RNSDO'TTIR, B., SUIHKO, M-L., GUSTAVSSON, P., THORKELSSON, G., SALO, S., SJO'BERG, A-M., NIELSEN, O. and BREDHOLT, S., "The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries", *Food Microbiology*, 21,217-25, 2004.
- GUGLIANDOLA, C., MAUGERÌ, T.L., CACAMO, D. and STACKEBRANDT, E., *Bacillus aeolius* sp. Nova Novel Thermophilic, Halophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy), *Systematic and Applied Microbiology*, 26/2, 172-176, 2003.

- GURAYA, R., FRANK, J.F. and HASSAN, A.N., Effectiveness of Salt, pH, and Diacetyl as Inhibitors for E.coli O157:H7 in Dairy Foods Stored at Refrigeration Temperatures. J.Food Prot., 61, 9, 1098-1102, 1998.
- GÜN, İ. ve EKİNCİ, F.Y., Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam, Gıda, 34 (3), 165-173, 2009.
- GÜNDÜZ, G.T. ve TUNCEL, G., Biofilm formation in an ice cream plant. Antonie Van Leeuwenhoek. 89(3-4), 329-336, 2006.
- HALLAM, N.B., WEST, J.R., FORSTER, C.F. and SIMMS, J., The potential for biofilm growth in water distribution systems Wat Res, 35, 4063-4071, 2001.
- HARTOG, R., Biocides in new antimicrobial materials. Chemistry today, Biocides today supplement, In: Chimiga Oggi, 22,37-39, 2004.
- HAUSNER, M. and WUERTZ, S., High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by in situ analysis. Appl.Environ.Microbiol., 65, 3710-3713, 1999.
- HAYES, P.R., Food Microbiology and Hygiene, Second Edition, Chapman & Hall, 34, 360-369, 1992.
- HELKE, D.M. and WONG, A.L., Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-Nitryl surfaces. J.Food Microbiol.20,104-105, 1992.
- HELKE, D.M., SOMERS, E.B. and WONG, A.L., Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and Buna-Nitryl in the presence of milk and individual milk components. J.Food. Prot. 56,479-484, 1992.
- HERALD, P.J. and ZOTTOLA, E.A., Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. J Food Sci 53: 1549-1552, 1987.
- HISAO, O. and HIROYUKI, W., Doğal Hokkai Fırınlanmış Kalsiyum Pudrasının Bakteri Azaltma Özelliğiyle İlgili Araştırma. Japonya Gıda Katkıları Bilimsel Kurulu., Nishimachi Atsutaku Nagoya, 156-224, 1999.
- HOLAH, J.T. and KEARNEY, L.R., Introduction to biofilms in the food industry. In: Melo, L.F.,Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), Biofilms: Science and Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 35-41, 1992.
- HOLAH, J.T., Progress report on CEN/TC 216/Working group 3:disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. International Biodeterioration Biodegradation, 36, 355-365, 1995.

HOOD, S.K., ZOTTOLA, E.A., Biofilms in food processing. *Food Control.*, 6, 9–18, 1995.

HOOD, S.K. and ZOTTOLA, E.A., Adherence to Stainless Steel by Foodborne Microorganisms during Growth in Model Food Systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37,145-153, 1997.

HUP, G., BANGMA, A., STADHOUDERS, J. and BOUMAN, S., Growth of thermoresistant streptococci in cheese milk pasteurizers, Some observations in cheese making. *Zuivelzicht*, 71, 1014-1016, 1979.

HUSSAIN, M., WILCOX, M.H. and WHITE, P.J., The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.*10: 191-207,1993.

JACKSON, A.T., Cleaning of Food Processing Plant. In: Thorne S, editor. *Developments in Food Preservation-* New York: Elsevier Science Publ. Co., 3,3, 95-125, 1985.

JANG, A., SZABO, J., HOSNI, A.A., COUGHLIN, M. and BISHOP, P.L., Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 368–376, 2006.

JAYARAMAN, A., CHENG, E.T., EARTHMAN, J.C. and WOOD, T.K., Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 18: 396–401, 1997.

JENKINSONH, F. and LAPIN-SCOTT, H.M., Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.* 9, 9-10,2000.

JEONG, D.K. and FRANK, J.F., Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J Food Prot*, 57, 576-586, 1994.

JIN, S.K., SONG, D.J., LEE, H.G, KIM, Y.G, PARK, T.S. and PARK, G.B., Effects of sodium lactate addition and lactic acid dipping on the cooking loss, salt, nitrite content, pH, WHC, water activity of sausage. *Kor. J. Animal. Sci.* 37, 379-386, 1995.

JOHAL, S., Bacterial adhesion to processing surfaces in the meat industry. PhD thesis, University of Surrey, UK, 1988.

JOSE´ BRINEZ, W., ROIG-SAGUE´S, A.X., HERRERO, M.H., LOPEZ-PEDEMONTE, T. and GUAMIS, B., Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Food Control*, 17, 516–521, 2006.

JOSEPH, B., OTTA, S.K. and KARUNASAGAR, I., Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int.J.Food.Microbiol.* 64,367-372, 2001.

KARAGÖZLÜ, C. ve KARAGÖZLÜ, N., Süt endüstrisinde deterjan ve dezenfektan kalıntılarının önemi. *HR. Ü.Z.F.Dergisi*, 8 (3/4),73-81, 2004.

KAYA, D. ve METİNTAŞ, S., Besin işleri ile uğraşan kişilerde *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı. *Türk Hij. Biyol. Derg.* 52(2) ,77-80, 1995.

KENNE, L., LINDBERG, B. and ASPINALL, G.O., *The Polysaccharides*, Academic Press, New York, 2, 287-363, 1983.

KINIK, Ö., GÖNÇ, S. ve AKALIN, A.S., Sütte patojen mikroorganizmalar. *Ege. Ün. Zir. Fak. Yayını*, İzmir. 1998.

KİM, Y.S., CHOİ, Y.M., NOH, D.O., CHO, S.Y. and SUH, H.J., The effect of oyster shell powder on the extension of the shelf life of tofu. *Food Chemistry*, 103, 155–160, 2007.

KJELLEBERG, S. and MOLIN, S., Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?. *Ecology Indust. Microbiol.*, 5, 254-258, 2002.

KOLUMAN, A., 2006. Biyofilm ve Gıda Hijyeni Yönünden Önemi. <http://vetgida.veterinary.ankara.edu.tr/bilimsel/biyofilm.pdf>., erişim tarihi: 16.05.2010.

KOMLOS, J., CUNNINGHAM, A.B. and SHARP, R.R. (1999). Population dynamics in a multi species biofilm for the creation of a reactive biobarrier. *Conference on Hazardous Waste Research*. <http://www.erc.montana.edu>., erişim tarihi: 11.04.2010.

KREFT, J.U. and WIMPENNY, J.W.T., Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water. Sci. Technol.*, 43,135-141, 2001.

KRESSE, J., Replacement of chlorinated hydrocarbons by waterbased cleaning systems. *Trans. Inst. Met. Finish*, 67, 109-115, 1989.

KRYSINSKI, E.P., BROWN, L.J. and MARCHISELLO, T.J., Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J.Food Prot.*, 55,246-251, 1992.

KUMAR, C.G. and ANAND, S.K., Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42, 9–27, 1998.

KÜPLÜLÜ, Ö., SARİMEHMETOĞLU, B. ve KAYMAZ, Ş., Pastörize sütlerde Elisa tekniği ile stafilkokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary&Ani mal Science*, 26, 631-637, 2002.



LAMOTHE, G.T., Molecular Characterization of Exopolysaccharide Biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. PhD thesis, L'Universite de Lausanne, Lausanne, Switzerland,, 2000.

LASA, I. and PENADÉS, J.R., Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol.*, 157,2, 99-107, 2006.

LATASA, C., SOLANO, C., PENADES, J. R. and LASA, I., Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 329, 11, 849-857, 2006.

LECHAVIER, M.W, CAWTHON, C.D. and LEE, R.G., Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies, *App. Environ. Microbiology*. 54,649-654, 1988.

LEE, SL. and FRANK, J.F., Effect of growth temperature and media on inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. *J Food Saf*, 11, 65–71, 1991.

LERICHE, V., SIBILLE, P. and CARPENTIER, B., Use of ELLSA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *App. Environ. Microbiol.* 66:1851-1856, 2000.

LINDSAY, D. and HOLY, A.V., What Food Safety Professionals should Know about Bacterial Biofilms? *British Food Journal*, 108, 1, 27-37, 2006a.

LINDSAY, D. and HOLY, A.V., Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*, 1-13, 2006b.

LINDSAY, D., GEORNARAS, I. and HOLY, A.V, “Biofilms associated with poultry processing equipment”, *Microbios*, 86, 105-16, 1996.

MAFU, A., ROY, D., GOULET, J. and MAGNY, P., The attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times, *J. Food Protection*, 53, 742-746, 1990.

MAH, T.F.C. and O'TOOLE, G.A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9,34-39, 2001.

MANNAERT, P., Detergents and disinfectant. I.D.F. Doc. No: 113, 57-62, 1979.

MARIS, P., Regulatory procedures for disinfectans in Europe. *International Biodeterioration and Biodegration*, 41, 297- 301, 1998.

MAROUANI-GADRI, N., CHASSAING, D. and CARPENTIER, B., Comparative evaluation of biofilm formation and tolerance to a chemical shock of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Journal of Food Protection*, 72, 157–164, 2009.

MARRIOTT, N.G., Principles of Food Sanitation, Second edition, An avi book, 101-113, 1989.

MARSHALL, K.C., Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. Am. Soc. Microbiol. News.,58, 202-207, 1992.

MARSHALL, K.C., STOUT, R. and MITCHELL, R., Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J. Gen. Microbiol. 68, 337-348, 1971.

MATTILA, T., MANNINEN, M. and KYLASIUIROLA, A.L., Effect of CIP disinfectants on wild bacterial strains isolated from milking line. J. Dairy. Res. 57,33-39, 1990.

MAUKONEN, J., MA'TTO", J., WIRTANEN, G., RAASKA, L., MATTILA-SANDHOLM, T. and SAARELA, M., Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30, 327-356, 2003.

MELO, L.F., BOTT, T.R., FLETCHER, M. and CAPDEVILLE, B., Biofilms: Science and Technology. In: NATO ASI Series E,Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands,1992.

MEYER, B., Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. Int. Biodeterioration Biodegrad, 51, 249-253, 2003.

MILLSAP, K.W., MEI, C.H., BOS, M. and BUSSCHER, J.H., Adhesive Interaction between Medically Important Yeasts and Bacteria, FEMS Microbiology Reviews. 21, 312- 336, 1998.

MOSTELLER, T.M. and BISHOP, J.R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. Journal of Food Protection, 56, 34-41, 1993.

MULLERAT, J., SHELDON, B.W. and KLAPES, N.A., Inactivation of *Salmonella* species and other food-borne pathogens with Salmide a sodium chlorite-based oxyhalogen disinfectant. Journal of Food Protection, 58, 535-540, 1995.

NEL, H.A., BAUER, R., WOLFAARDT, G.M. and DICKS, L.M.T., Effect of bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. American Society for Enology and Viticulture., 53(3),191-196, 2002.

NELSON, J., Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? Dairy Food Environ San, 10(6), 344-5, 1990.

NICKELSON, N. and SCHMIDT, C., Taking the hysteria out of *Listeria*: the mechanics of *Listeria* and the strategies to find it. Food Qual, 5(4),28-35, 1999.

O'BRIEN, S.S., LINDSAY, D. and HOLY, A.V., "The presence of Enterococcus, coliforms and E. coli in a commercial yeast manufacturing process", International Journal of Food Microbiology, 94, 23-31, 2004.

OULAHAL, N., MARTIAL-GROS A., BONNEAU, M. and BLUM, L.J., Removal of Meat Biofilms from Surfaces by Ultrasounds Combined with Enzymes and/or a Chelating Agent. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, 192–196, 2007.

OULAHAL, N., BRICE, W., MARTIAL, A. and DEGRAEVE, P., Quantitative Analysis of Survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on Two Types of Surfaces: Polypropylene and Stainless Steel in Contact with Three Different dairy products. Food Control, 19, 178–185, 2008.

ÖLMEZ, Z., Süt Sanayisinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi. Y.Lisans Tezi, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.

ÖZDEN, Ö., BAŞARAN, F. ve MUHTAROĞLU, G., Akuakültürde Yeni Bir Uygulama: Ozon Teknolojisi, Aquaculture and Fisheries, 22-28, 2006.

ÖZTAN A. Et bilimi ve teknolojisi. Ankara. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi yayınları yayın no: 19, 1993.

PADERA, RF., Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. Cardiovasc Pathol 15, 264– 270, 2006.

PALA, T.R. and SEVILLA,A., Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant, Journal of Food Protection. 67, (8), 1624–1629, 2004.

PALMER, J., Detergent and disinfectans. residues and contaminants in milk and milk products. Chapter 11. IDF Special Issue 9101, Belgium, 173-189, 1991.

PAN, Y., JUNIOR, F.B. and KATHARIOU, S., Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Applied and Environmental Microbiology, 72, 7711–7717, 2006.

PARK, H., HUNG, Y-C. and CHUNG, D., Effects of chloride and Ph on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 91, 13–18, 2004.

PEACOCK, E., JACOB, V.W. and FALLONE, S.M., *E.coli* O157:H7:Ethiology, Clinical Features, Complications, and Treatment. Nephrology Nursing Journal, 28,5, 547-554, 2001.

PEARSON, K. and KARATAN, E., Biofilm Development in Bacteria. Advance in Applied Microbiology, 57, 79-111, 2005.

- PERNI, S., ALDSWORTH, T.G., JORDAN, S.J., FERNANDES, I., BARBOSA, M., SOL, M., TENREIRO, R.P., CHAMBEL, L., ZILHÃO, I., BARATA, B., ADRIÃO, A., FALEIRO, M.L., ANDREW, P.W. and SHAMA, G., The Resistance to Detachment of Dairy Strains of *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel by Shear Stress is Related to The Fluid Dynamic Characteristics of The Location of Isolation. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 384–390, 2007.
- POULSEN, L.V., Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6), 321-326, 1999.
- PRATTEN, J., FOSTER, S.J., CHAN, P.F., WILSON, M. and NAIR, S.P., *Staphylococcus aureus* Accessory Regulators: Expression within Biofilms and Effect on Adhesion. *Microbes and Infection*, 3, 633–637, 2001.
- RAFFA, R.B., IANNUZZO, J.R. and LEVINE, D.R., Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 417-423, 2005.
- RAMESH, H.P. and THARANATHAN, R.N., Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173, 2003.
- REITSMA, C.J. and HENNING, D.R., Survival of Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 During the Manufacture and Curing of Cheddar Cheese. *J.Food Prot.*, 1996; 59:5, 460-464, 1996.
- RESCH, A., FEHRENBACHER, B., EISELE, K., SCHALLER, M. and GOTZ, F., Phage Release from Biofilm and Planktonic *Staphylococcus aureus* Cells. *FEMS Microbiology Letters*, 252, 89-96, 2005.
- REUTER, G., Disinfection and hygiene in the field of food of animal origin, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 209-215, 1998.
- RIJNAARTS, H.H., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, L. and ZEHNDER, H., Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3255-3265, 1993.
- RITTMANN, B.E., Detachment from biofilms. In: Characklis, 20–25. W.G., Wilderer, P.A. (Eds.), *Structure and Function of Biofilms*. John Wiley, New York, USA, 49–58, 1989.
- RIVERA-BETANCOURT, M., SHACKELFORD, S.D., ARTHUR, T.M., WESTMORELAND, K.E., BELLINGER, G., ROSSMAN, M., REAGAN, J.O. and KOOHMARAÏE, M., Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of food protection*, 67, 295–302, 2004.
- ROSENBERG, M. and KJELLEBERG, S., Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology*, 9, 353-393, 1986.

ROSSONI, E.M.M. and GAYLARDE, C.C., Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *J. Food Microbiol.* 61, 81-85, 2000.

RYU, J.-H., KIM, H., FRANK, J.F. and BEUCHAT, L.R., Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 359–362, 2004.

SAILS, A.D., BOLTON, F.J., FOX, A.J., WAREING, D.R. and GREENWAY, D.L., Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1319-24, 2002.

SAMELIS, J., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A. and SMITH, G.C., Influence of the natural microbial flora on acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination fluids. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2410–2420, 2001a.

SAMELIS, J., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A. and SMITH, G.C., Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT 104, and *Listeria monocytogenes* in fresh meat decontamination fluids at 4 and 10°C. *J. Food Prot.* 64, 950–957, 2001b.

SAMELIS, J., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A. and SMITH, G.C., Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat decontamination washing fluids and potential effects of organic acid interventions on the microbial ecology of the meat plant environment. *J. Food Prot.* 65, 33–40, 2002.

SAMELIS, J., KAKOURIA, A., ROGGAB, K.J. and SAVVAIDISB, I.N., KONTOMINASB, M.G., Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiology*. 20, 661–669, 2003.

SAMELIS, J., KENDALL, P., SMITH, G. and SOFOS, J.N., Acid tolerance of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 following habituation (10°C) in fresh beef decontamination runoff fluids of different pH values. *J. Food Prot.* 67, 638–645, 2004.

SAMELIS, J., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A. and SMITH, G.C., Survival or growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a model system of fresh meat decontamination runoff waste fluids and its resistance to subsequent lactic acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6228–6234, 2005.

SANDER, J.E. and WILSON, J.L., Effect of Hydrogen Peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity, *Avian Diseases*, 43, 227-233., 1999.

SAWAI, J., SHIGA, H. and KOJIMA, H., Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 211-218, 2001.

SCHWACH, T.S. and ZOTTOLA, E.A., Use of scanning electron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. *J. Food Sci.* 47, 1401- 1405, 1982.

SHANKAR, S., YE, R.W., SCHLICHTMAN, D. and CHAKRABARTY, A.M., Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 70, 221–255, 1995.

SHARMA, M. and ANAND, S.K., Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627-636, 2002.

SILAGYI, K., KIM, S-H., LO, Y.M. and WEI, C., Production of Biofilm and Quorum Sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and Its Transfer From Contact Surfaces to Meat, Poultry, Ready-to-Eat, Deli, and Produce Products. *Food Microbiology*, 26, 514–519, 2009.

SKANDAMIS, P.N., STOPFORTH, J.D., ASHTON, L.V., GEORNARAS, I., KENDALL, P.A. and SOFOS, J.N., *Escherichia coli* O157:H7 Survival, Biofilm Formation and Acid Tolerance under Simulated Slaughter Plant Moist and Dry Conditions. *Food Microbiology*, 26,112–119, 2009.

SOMERS, E.B. and WONG, A.C.L., Efficacy of Two Cleaning and Sanitizing Combinations on *Listeria monocytogenes* Biofilms Formed at Low Temperature on a Variety of Materials in the Presence of Ready-to-Eat Meat Residue. *Journal of Food Protection*, 67, 10, 2218-2229, 2004.

SOMERS, E.B., JOHNSON, M.E. and WONG, A.C.L., Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol.* 22, 269-276, 1994.

SOMERS, E.B. and WONG, A.L. (1999). *Listeria monocytogenes* biofilm formation and inactivation in ready to eat (RTE) meat processing environments. <http://www.wisc.edu>, erişim tarihi:18.05.2010.

SOMERS, E.B. and WONG, A.L. (2001). *Listeria monocytogenes* biofilm formation in ready to eat (RTE) meat processing environments. <http://www.wisc.edu>, erişim tarihi:18.05.2010.

STEWART, P.S., ROE, F. and REYNER, J., Effect of catalase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetration into *P. aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 66, 836-838, 2000.

STINGELE, F., NEESER, R.R. and MOLLET., B., Identification and Characterization of the EPS (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol*, 178, 1680-1690, 1996.

SUDHAKAR, P., RAO, N., BHAT, R.V. and GUPTA, C.P., The economic impact of a foodborne disease outbreak due to *S. aureus*. J. Food Prot. 51 (11), 898-900, 1988.

SUNDHEIM, G., LANGSRUD, S., HEIR, E. and HOLCK, A. L., Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds, International Biodeterioration & Biodegradation, 41, 235-239, 1998.

SUTHERLAND, I.W., Microbial Exopolysaccharide synthesis, In Extracellular Microbiya Polysaccharide (eds Sanford, P. A. and Laskin, A.) Am. Chem. Soc., Washington., 40-57, 1977.

SUTHERLAND, I.W., Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.

SUTHERLAND, I.W., Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, Trends Biotechnol, 16, 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I.W., Biofilm exopolysaccharites: A strong and sticky framework. Microbiology. 147,3-9, 2001.

ŞEN, Y., ODABAŞI, G. ve MUTLU, M., Gıda Endüstrisinde Kullanılan Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Mikrobiyal Tutunmanın Engellenmesi, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 918-922, 2008.

ŞENER, A. ve TEMİZ, A., Tavuk Kesimhane ve İşletmelerinde Kullanılan Ticari Dezenfektanlar ve Etkinlikleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2, 10, 1-28, 2004.

TEALE, C.J., Antimicrobial resistance in food chain. J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement. 92, 85-89, 2002.

TEKİNŞEN, O.C. ve KELEŞ, A., Staphylococcus aureus ve stafiloenterotoksikozis. Türk Vet. Hek. Derg. 6 (2), 41-44, 1994.

TEMİZ, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Üçüncü Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 216-232, 2000.

TEMİZ A., Gıda İşletmelerinde Hijyen ve Sanitasyon. Gıda Denetçisi Eğitimi Semineri. Ankara. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 19, 2001.

TODD, E.C.D., Preliminary Estimates of costs of foodborne disease in the United States. J. Food Prot. 52 (8), 595-601, 1989.

TORMO, M.A., KNECHT, E., GÖTZ, F., LASA, I. and PENADE'S, J.R., Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? Microbiology. 151, 2465-2475, 2005.

TORRES, K., SIERRA, S., POUTOU, R., CARRASCAL, A. and MERCADO, M., Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. Revista MVZ Córdoba, 10, 511–543, 2005.

TOYODA, M., ITO, Y., IWADA, M., UTSUGI, Y., OHASHI, M. and FUJII, M., Simple and rapid determination of hydrogen peroxide contained in milk by use of an oxygen electrode. N.Z.J. Dair. Sci. Techn., 17, 41-46, 1998.

TRACHOO, N. and FRANK, J.F., Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni* containing biofilms. J. Food Prot., 65, 1117-21, 2002.

TUNÇBİLEK, S., BAYKAM, N., EREN, N. ve ÖZTÜRK, S., Pozitif Kan Kültürlerinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi, Turk. Hij. Dern. Biyol. Dergisi, 56, 1, 1-5, 1999.

UHLICH, G.A., SINCLAIR, J.R., WARREN, N.G., CHMIELECKI, W.A. and FRATAMÍCO, P., Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with two multistate food-borne outbreaks that occurred in 2006. Applied and Environmental Microbiology, 74, 1268–1272, 2008.

UNNERSTAD, H., BANNERMAN, E., BILLE, J., DANIELSSONTHAM, M. L., WAAK, E. and THAM, W., Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 50, 493–499, 1996.

UNTERMAN, F., Zum Vorkommen von enterotoxinbildenden Staphylokokken die Menschen. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A., 22, 18-26, 1972.

WEYER, A.V.D., DEVLEESCHOUWER, M. J. and DONY, J., Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. Journal of Applied Bacteriology, 74, 480–483, 1993.

VAN KRANENBURG, R.J. D., MARUGG., I.I. VAN SWAM., N.J. and WILLEM, W. M., Molecular Characterization of the Plasmid-Encoded EPS gene cluster Essential for Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol., 24, 387-397, 1997.

VAN KRANENBURG, R.H.R., VOS. I. I., VAN SWAM, M. and KLEEREBEZEM, W. M., Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity. J. Bacteriol., 181, 6347-6353, 1999.

VATANYOOPAISARN, S., NAZLI, A., DODD, C.E., REES, C.E. and WAITES, W.M., Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2, 860-3, 2000.

VERNOZY-ROZAND, C. and ROZE, S., Bilan Des Connaissances Relatives Aux *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC). French Food Safety Agency, Maisons-Alfort (France), 2003, <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-STEC.pdf>. erişim tarihi: 14.04.2010.



WATNICK, P. and KOLTER, R., Biofilm city of microbes. *J.Bacteriol.* 182:2675-2679, 2000.

WILLIAMS, J.F. and WORLEY, S.D., Types of biocides. *Encyclopedia of food microbiology*. Robinson, R. K., Batt, C. A., Radip, P. and Palet, D. (eds.), Volume II, Academic press. 1794-1801, 2000.

WILLIAMS, V. and FLETCHER, M., *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,1004, 1996.

WIRTANEN, G., SAARELA, M. and MATTILA-SANDHOLM, T., Biofilms impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), *Biofilms II: Process analysis and applications*, 327–372, 2000.

WONG, A.C.L., Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci.*, 81, 2765–2770, 1998.

WONG, A.L. and RABOTSK, E., (1993). Interaction of chemical, thermal and physical actions on the removal of bacteria from milk contact surfaces. *The American Society Of Agricultural Engineers*, <http://www.asae.org>, erişim tarihi:27.03.2010.

WONG, A.L. (1994). Biofilms in cheese processing environments. <http://www.wisc.edu>, erişim tarihi:18.05.2010.

YALPANI, M. and SANDFORD, P.A., Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, *Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.

YERLİKAYA, O., KINIK, Ö. ve AKBULUT, N., Peyniraltı Suyunun fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *Gıda*, 35, 4, 289-296, 2010.

YU, K., NEWMAN, M.C., ARCHBOLD, D.D. and HAMILTON–KEMP, T.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry fruit and reduction of population by chemical agents. *Journal of Food Protection*, 64, 1334–1340, 2001.

ZHAO, Q., Effect of surface free energy of graded Ni-P-PTFE coating on bacterial adhesion. *Surface and Coating Technology*, 185, 199-204, 2004.

ZHAO, Q. and LIU, Y., Modification of stainless steel surfaces by elektroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. *Journal of Food Engineering*, 72, 266-272, 2006.

ZIVKOVIĆ, J., UHITIL, S. and HADZIOSMANOVIĆ, M., The Occurrence of *Listeria spp.* in Meat in the Republic of Croatia. 3 rd World Congress Foodborne Infection and Intoxications. Berlin 27, 501-505, 1992.

ZOTTOLA, E.A., Reflections on *Salmonella* and other “wee beasts” in foods. Food Techn. 55(9). 60-67, 2001.

ZOTTOLA, E.A. and SASAHARA, K.C., Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? International Journal of Food Microbiology. 23, 125–148,1994

## EKLER

### EK A. Peynir Altı Suyu ve Et Tezgahı Yıkama Suyuna Eklenen *Listeria monocytogenes*, *Esheria coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* Hücre Sayıları

EK A 1. Peynir altı suyuna eklenen *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* hücre sayıları (log<sub>10</sub>kob/ml)

Mikroorganizma Türleri	Örnek Tekerrür Sayısı (n)	İşlem Süreleri (dak)		
		1	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	1	8.98	9.02	8.89
	2	9.02	9.12	8.94
	3	9.06	9.22	8.99
<i>E. coli</i> O157:H7	1	8.94	8.90	8.92
	2	9.10	8.96	9.00
	3	9.26	9.02	9.08
<i>S. aureus</i>	1	8.95	8.92	9.04
	2	8.98	9.06	9.11
	3	9.03	9.20	9.18

EK A 2. Et tezgahı yıkama suyuna eklenen *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* hücre sayıları ( $\log_{10}$ kob/ml)

Mikroorganizma Türleri	Örnek Tekerrür Sayısı (n)	İşlem Süreleri (dak)		
		1	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	1	8.92	9.00	9.03
	2	9.05	9.08	9.12
	3	9.18	9.16	9.21
<i>E. coli</i> O157:H7	1	8.92	8.83	8.98
	2	9.02	8.92	9.01
	3	9.12	9.01	9.04
<i>S. aureus</i>	1	8.91	8.90	9.08
	2	8.96	9.04	9.14
	3	9.01	9.18	9.20

**EK B. Peynir Altı Suyu ve Et Tezgahı Yıkama Suyunda Gelişen ve Paslanmaz Çelik Plakalara Tutunmuş *L. monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 ve *S.aureus* hücre sayıları ve Steril Suyun, % 0.25 ve 0.50 Konsantrasyonlu Midye Kabuğu Tozu Çözeltilisinin Tutunmuş Bu Mikroorganizmaları Temizleme Etkisi**

EK B 1. Et tezgahı yıkama suyunda gelişen ve paslanmaz çelik plakalara tutunmuş *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücre sayıları ve steril suyun, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin tutunmuş bu mikroorganizmaları temizleme etkisi ( $\log_{10}\text{kob/cm}^2$ )

Mikroorganizma Türleri	Uygulanan İşlemler	Örnek Tekerür Sayısı (n)	İşlem Süreleri (dak)			
			1	5	10	
<i>L. monocytogenes</i>	Yıkanmamış	1	12.26	11.18	11.24	
		2	11.76	10.68	10.76	
		3	11.26	10.18	10.28	
	Suyla yıkanmış	1	11.29	10.20	10.46	
		2	10.86	9.85	9.92	
		3	10.43	9.50	9.38	
	% 0.25 MKT	1	8.32	7.63	7.14	
		2	7.92	6.73	6.94	
		3	7.52	5.93	6.74	
	% 0.50 MKT	1	8.07	5.89	6.40	
		2	7.46	5.76	6.36	
		3	6.85	5.63	6.32	
	<i>E. coli</i> O157:H7	Yıkanmamış	1	11.66	11.08	10.66
			2	11.29	10.64	10.45
			3	10.92	10.20	10.24
Suyla yıkanmış		1	10.50	10.27	10.33	
		2	10.08	9.89	9.93	
		3	9.66	9.51	9.53	
% 0.25 MKT		1	8.45	8.61	8.19	
		2	8.13	8.03	7.74	
		3	7.81	7.45	7.29	
% 0.50 MKT		1	7.24	7.30	6.02	
		2	6.50	6.60	5.04	
		3	5.76	5.90	4.06	
<i>S. aureus</i>		Yıkanmamış	1	10.59	11.06	11.26
			2	10.38	10.89	10.80
			3	10.17	10.72	10.34
	Suyla yıkanmış	1	9.86	9.83	9.86	
		2	9.56	9.58	9.52	
		3	9.26	9.33	9.18	
	% 0.25 MKT	1	8.10	8.00	7.92	
		2	7.83	7.94	7.83	
		3	7.56	7.88	7.74	
	% 0.50 MKT	1	7.42	7.41	7.56	
		2	6.99	7.20	7.45	
		3	6.56	6.99	7.34	

EK B 2. Peynir altı suyunda gelişen ve paslanma çelik plakalara tutunmuş *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* hücre sayıları ve steril suyun, % 0.25 ve 0.50 konsantrasyonlu midye kabuğu tozu çözeltisinin tutunmuş bu mikroorganizmaları temizleme etkisi ( $\log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$ )

Mikroorganizma Türleri	Uygulanan İşlemler	Örnek Tekerrür Sayısı (n)	İşlem Süreleri (dak)		
			1	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	Yıkanmamış	1	8.66	10.38	10.44
		2	8.34	9.93	10.00
		3	8.02	9.48	9.56
	Suyla yıkanmış	1	7.91	9.98	10.11
		2	7.63	9.64	9.63
		3	7.35	9.30	9.15
	% 0.25 MKT	1	5.03	6.49	6.43
		2	4.85	6.17	6.08
		3	4.67	5.85	5.73
	% 0.50 MKT	1	4.56	5.58	5.47
		2	4.53	5.51	5.44
		3	4.50	5.44	5.41
<i>E. coli</i> O157:H7	Yıkanmamış	1	11.55	10.68	10.84
		2	11.08	10.13	10.28
		3	10.61	9.58	9.72
	Suyla yıkanmış	1	10.38	9.66	10.44
		2	10.00	9.03	10.08
		3	9.62	8.40	9.72
	% 0.25 MKT	1	8.36	7.43	6.15
		2	7.80	6.99	6.11
		3	7.24	6.55	6.07
	% 0.50 MKT	1	6.17	5.18	6.04
		2	5.69	4.30	5.60
		3	5.21	3.42	5.16
<i>S. aureus</i>	Yıkanmamış	1	9.61	10.86	11.06
		2	9.45	10.18	10.20
		3	9.29	9.50	9.34
	Suyla yıkanmış	1	9.14	10.76	10.45
		2	8.36	9.95	9.77
		3	7.58	9.14	8.39
	% 0,25 MKT	1	5.72	6.40	6.45
		2	5.32	6.16	6.13
		3	4.92	5.92	5.81
	% 0,50 MKT	1	4.86	4.71	4.79
		2	4.76	4.32	4.53
		3	4.66	3.93	4.27

## ÖZGEÇMİŞ

Tülay DURAN, 06.04.1984 de Çorlu' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2002 yılında Atatürk Süper Lisesi Fen Bölümünden mezun oldu. 2003 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nü 2008 yılında bitirdi. 2008 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2011 yılında mezun oldu.