ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gözde KOÇ

PROBİYOTİK *Bacillus coagulans*'ın ANTİLİSTERİAL ve ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK *Bacillus coagulans*'ın ANTİLİSTERİAL ve ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Gözde KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 09/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

……	……	……
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA	Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ	Dr. Öğr. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-11233

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROBİYOTİK *Bacillus coagulans*'ın ANTİLİSTERİAL ve ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Gözde KOÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Yıl: 2020, Sayfa: 53
Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Dr. Öğr. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada, probiyotik özelliği olduğu bilinen *Bacillus coagulans*'ın *Listeria innocua*'nın gelişimi üzerine antilisterial ve antibiyofilm etkisi araştırılmıştır.

Biyofilm oluşumunda mikrotiter plak yöntemi ve antimikrobiyel denemelerde agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan *L. innocua* biyofilmlerinin %4 kristal viyole ilavesiyle 620 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.285 bulunmuştur. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşumunu göstermiştir. *L. innocua* tarafından üretilen biyofilmlere karşı probiyotik *B. coagulans*'ın antibiyofilm özelliğinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada ise, probiyotik

B. coagulans ve %4 kristal viyole ilavesiyle 620 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.073 bulunmuştur.

Çalışmadan elde edilen sonuçta *L. innocua* üzerine doğrudan probiyotik özellikteki *B. coagulans* inokülasyonuyla hücre sayısında 6.64 log kob/mL düzeyde azalma meydana gelmiştir. Bu azalma, *L. innocua* gelişimi üzerine probiyotik *B. coagulans* bakterisinin inhibe edici etkisinin bulunduğunu göstermektedir.

Antimikrobiyel denemelerde ise probiyotik *B. coagulans*'ın
L. innocua üzerine antilisterial etkisi saptanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, Probiyotik, Antibakteriyel, *Listeria innocua, Bacillus coagulans*

ABSTRACT

MSc. THESIS

DETERMINATION OF ANTILISTERIAL and ANTIBIOFILM PROPERTIES OF PROBIOTIC *Bacillus coagulans*

Gözde KOÇ

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2020, Page: 53
Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Asst. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

In this study, antilisterial and antibiofilm effects of *Bacillus coagulans* known to have probiotic properties on the development of *Listeria innocua* were investigated.

Microtiter plates method was used for biofilm formation and agar well diffusion method was used in antimicrobial trials. *L. innocua* used in the study was determined to synthesize biofilm after 48 hours. The absorbance value of *L. innocua* biofilms measured at 620 nm with the addition of 4% crystal violet was found to be 0.285. Absorbance value >0.1 showed biofilm formation. In the study conducted to determine the antibiofilm properties of probiotic *B. coagulans* against biofilms produced by *L. innocua*, probiotic *B. coagulans* and with the addition of 4% crystal violet absorbance value at 620 nm was found 0.073.

As a result of this study, with direct probiotic *B. coagulans* inoculation on *L. innocua* the number of cells decreased by 6.64 log cfu / mL. This decrease indicates that the probiotic *B. coagulans* bacteria have an inhibitory effect on the development of *L. innocua*.

In antimicrobial trials, no antilisterial effect of probiotic *B. coagulans* on *L. innocua* could not be determined.

Key words: Biofilm, Probiotic, Antibacterial, *Listeria innocua, Bacillus coagulans*

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Probiyotik sözcüğü, "yaşam için" anlamına gelmektedir ve özellikle son yıllarda insan ve hayvanlar için yararlı etkileri olan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Gıdaların üretiminde en çok kullanılan probiyotikler *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleridir. Bunlara göre daha az bilinen *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Enterococcus* ve spor oluşturan *Brevibacillus*, *Bacillus* ve *Sporolactobacillus* cinsi bakterilerden de probiyotik özellik amacıyla yararlanılabilmektedir (Sanders ve ark, 2003; Patel ve ark, 2009). *Bacillus* spp.'nin faydaları arasında, diğer probiyotik özelliği taşıyan mikroorganizmalarda da olduğu gibi; bağışıklık sistemini düzenlemesi, antimikrobiyel madde üretimi ve bağırsak mikrobiyotasını iyileştirme özelliği bulunmaktadır (Cutting, 2002; Tam ve ark, 2006). Antimikrobiyel madde sentezleyen *Bacillus*'lar; *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thruringiensis*, *B. Amyloliquifaciens*, *B. thermoleovorans* ve *B. licheniformis*'tir (Lisoba ve ark, 2006; Xie ve ark, 2009). *Bacillus*'lar antibiyotik ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddeler de salgılamaktadırlar. Bu maddeler genel olarak gıda, tıp ve biyolojik mücadelede kullanılmaktadır.

L. monocytogenes önemli bir patojen bakteri olarak bilinmektedir. Birçok çiğ, yarı işlemden geçen, pişirilmiş ve kullanıma hazır üründe genel olarak gramda 10 mikroorganizmanın (kob/g) altında değerlerde tespit edilen *L. monocytogenes*'in kolaylıkla ürediği ürünlerin çoğunluğunda süt, yumuşak peynirler, işlenmiş sebzeler, sosis, pişirilmiş et ve kanatlı et, tütsülenmiş balık, deniz ürünleri yer almaktadır (Liu, 2008).

Son zamanlarda yapılan farklı çalışmalar, basınç, pH ve sıcaklık gibi farklı çevresel stres yöntemlerine karşı çok dayanıklı olduğu bilinen *Listeria* çeşitlerinin ayrıca biyofilm meydana getirme ve ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) oluşturma kabiliyetinin bulunduğunu göstermektedir (Slama ve ark, 2013). Özellikle gıda işletmelerinde *L. monocytogenes* türünün farklı mikrobiyota içeren biyofilm içinde gelişim gösterdiği ve bunun besin bulaşılarının temel sebebini

oluşturduğu yapılmış çalışmalarda bulunmaktadır. Bu sebeple *Listeria* türlerinin biyofilm meydana getirme kabiliyetleri gıda sanayisi açısından çok önemlidir (Guerrieri ve ark, 2009).

L. innocua ve *L. monocytogenes* türleri arasında benzerlik oranının yüksek olması, aynı ortamlardan izole edilmesi ve *L. innocua*'nın insan için patojen olmamasından dolayı, laboratuvar güvenliği açısından *L. monocytogenes* yerine *L. innocua* çalışmalarda tercih edilmektedir (Sorrentino ve ark, 2018).

Bu çalışmada da, işletmelerde yüzeye yapışan bakterilerin ortamdan tamamen uzaklaştırılamadığı koşullarda gıdanın kalitesi ve güvenliğini tehdit eden biyofilmlerin oluşumunun engellenmesi ve gıda bulaşılarının ortadan kaldırılması amacıyla *L. innocua* kullanılarak, probiyotik özellikte olan *B. coagulans*'ın antilisterial ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada öncelikle *L. innocua*'nın biyofilm sentezleme özellikleri tespit edilmiş, daha sonra probiyotik *B. coagulans*'ın *L. innocua* üzerine antibiyofilm ve antilisterial etkisi araştırılmıştır.

B. coagulans'ın, *L. innocua* üzerine inhibisyon etkisi, hem süpernatant hem de direk hücre süspansiyonu kullanılarak, agar kuyu difüzyon yöntemi ile inkübasyonun 48. saatlerinde incelenmiş fakat zon oluşumu gözlemlenememiştir.

Direnç mekanizması; mikroorganizma türleri, antibiyotik cinsi, insan ve çevrenin etkileşimi ile şekillenen karmaşık bir olgudur. Bu nedenle bazı bakterilerde doğal ya da sonradan kazanılmış direncin göz önüne alınması gerekmektedir.

Denemelerde kullanılan *L. innocua* suşundan biyofilm elde edilerek doğrulama testleri yapılmış ve bu testin sonucunda *L. innocua* suşunun biyofilm ürettiği doğrulanmıştır. Biyofilm elde edildikten sonra tutunan hücre sayısı hesaplanmak üzere belirli seyreltmeler yapılarak ekim yapılmış ve 48 saat sonra biyofilme tutunan hücrelerin sayımı yapılmıştır.

L. innocua biyofilmlerinin %4 kristal viyole ilavesiyle 620 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.285 bulunmuştur. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm

oluşumunu göstermiştir. Bu durumda 48 saat sonunda 620 nm'de ölçümü yapılan *L. innocua*'nın biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

Denemede *L. innocua* canlı hücre sayısı 5.08 log kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Denemelerde kullanılan probiyotik özellikteki *B. coagulans*'ın *L. innocua* biyofilm oluşumunu önlediği tespit edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçta *L. innocua* hücre sayısı 11.68 bulunurken; *L. innocua* üzerine doğrudan probiyotik özellikteki *B. coagulans* inokülasyonuyla hücre sayısı 5.04'e düşmüştür. Bu azalma, *L. innocua* gelişimi üzerine probiyotik *B. coagulans* bakterisinin inhibe edici etkisinin bulunduğunu göstermektedir.

48 saat sonunda 620 nm' de *L. innocua*'nın ölçülen absorbans değerleri 0.285'dir. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Aynı şekilde 48 saat sonunda 620 nm' de *L. innocua* üzerine *B. coagulans* inokülasyonu sonucu ölçülen absorbans değerleri ise 0.073 olarak tespit edilmiştir. Absorbans değerinin <0.1 olması ise *L. innocua* biyofilmi oluşumu üzerine probiyotik *B. coagulans*'ın biyofilm oluşumunu engelleyici özelliğinin bulunduğunu göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli yardım ve katkılarını, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya, çalışma aşamasında sürekli bilgi alışverişinde bulunduğum, tezimin her aşamasında emeği geçen, her konuda ve her zaman yardımcı olan sayın hocam Ar. Gör. Gözde KONURAY'a, Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ ve Dr. Öğretim Üyesi Emel ÜNAL TURHAN'a yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili annem Gülnaz KOÇ, sevgili babam İbrahim KOÇ ve sevgili erkek kardeşim Kaan KOÇ'a, laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında desteğini gördüğüm sevgili kız kardeşim Demet KOÇ'a ve hayatlarımızı birleştirdiğimiz günden itibaren varlığı ile güçlü hissettiren ve her konuda destek olan sevgili eşim Nihat KESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
2.1. Biyofilm Oluşumu ve Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi 9
2.2. Listeria monocytogenes ve Biyofilm Sentezleme Özelliği 15
2.3. Bacillus coagulans ve Probiyotik Olarak Önemi 19
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Mikroorganizmalar 23
3.1.2. Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar 23
3.2.Metod 24
3.2.1. Stok Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması 24
3.2.2. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antilisterial Özelliğinin Belirlenmesi 24
3.2.3. *Listeria innocua*'nın Biyofilm Sentezleme Özelliğinin Belirlenmesi 25
3.2.3.1. *Listeria innocua* Biyofilmlerinde Tutunan Hücre Sayılarının Belirlenmesi 26
3.2.3.2. Biyofilm Doğrulama Testi 26
3.2.4. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antibiyofilm Özelliğinin Belirlenmesi 28

3.2.4.1.Antibiyofilm Denemesinde Plaklara Tutunan *L. innocua* Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi 29
3.2.5. İstatistiksel Analizler 29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 31
4.1. Probiyotik Bacillus coagulans'ın Antilisterial Özelliğinin Belirlenmesi 31
4.2. Listeria innocua'nın Biyofilm Sentezleme Özelliğinin Belirlenmesi ve Canlı Hücre Sayımı 32
4.3. Bacillus coagulans'ın Antibiyofilm Özelliğinin Belirlenmesi ve Canlı Hücre Sayımı 34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 37
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 53

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler 10
Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri 23
Çizelge 4.1. *Listeria innocua* Biyofilmlerinde Tutunan Canlı Hücre Sayısı 33
Çizelge 4.2. *L. innocua* 'nın Biyofilm Sentezi ve *B. coagulans*'ın Antibiyofilm Özelliği 35

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları..... 11
Şekil 2.2. *Listeria monocytogenes'*in elektron mikroskobu görüntüsü 19
Şekil 3.1. a. L. innocua biyofilm sentezleme özelliğinin belirlenmesi..... 25
Şekil 3.1. b. L. innocua biyofilm sentezleme özelliği 26
Şekil 3.2. a. L. innocua tarafından üretilen biyofilm doğrulama testi 27
Şekil 3.2. b. L. innocua tarafından üretilen biyofilm doğrulama testi 28
Şekil 3.3. B. coagulans bakterisinin antibiyofilm özelliği..... 29
Şekil 4.1. *Bacillus coagulans'ın Listeria innocua* üzerine inhibisyon etkisi..... 32

1. GİRİŞ

Probiyotik sözcüğü, "yaşam için" anlamına gelmektedir ve özellikle insan ve hayvanlar için yararlı etkiler sağlayan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Probiyotikler için 1960'lı yıllardan bu yana çeşitli tanımlar yapılmıştır. Fakat Dünya Sağlık Örgütü/Gıda ve Tarım Örgütü (WHO/FAO) uzmanlarının yaptığı "yeterli miktarda alındığı zaman sağlığa yararlı etki sağlayan canlı mikroorganizmalardır" şeklindeki mevcut son tanım çoğunlukla kabul görmektedir (Makinen ve ark, 2012).

Probiyotiklerin, tüketici sağlığına yararlılık sağlaması için vücuda canlı olarak 10^7-10^9 kob/g olarak alınması gerekir (Küçükçetin ve ark, 2016; Yıldıran ve ark, 2017). Probiyotiklerin düzenli olarak ve belirli sayıda kullanımlarının yanısıra, kullanılan bakterilerin sindirim sisteminde safra tuzları, çeşitli enzimler, mide asitliği vb. gibi ekstrem ortamlarda da canlılığını koruması ve yeterli miktarda bağırsaklara ulaşıp, kolonize olması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların stabilitesinin ve canlılığının devamı, çok farklı ürünlerde, üretim aşamasında, depolama ve satış aşamasında ciddi bir problem oluşturmaktadır. Probiyotik çeşitlerin seçiminde, ilgili yeni üretim teknolojileri ve formülasyonları gözönünde bulundurularak, fonksiyonel özellikleri olanlar öncelikli olarak tercih edilmektedir (Mattila-Sandholm ve ark, 2002; Ouwehand ve ark, 2002).

Probiyotikler, destek tedavi olarak kullanıma sunulabileceği gibi tüketime sunulmuş gıdalara da eklenebilir. Gıdaların üretiminde en çok kullanılan probiyotikler *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleridir. Bunlara göre daha az bilinen *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Enterococcus* ve spor oluşturan *Brevibacillus*, *Bacillus* ve *Sporolactobacillus* cinsi bakterilerden de probiyotik özellik amacıyla yararlanılabilmektedir (Sanders ve ark, 2003; Patel ve ark, 2009).

Bacillus cinsi bakteriler, çubuk şeklinde, genelde aerob (bazı türleri fakültatif aerob) ve endospor yapma yeteneğinde olan bir Gram pozitif bakteridir

(Kaynar ve Beyatlı, 2006; Ikeda ve ark, 2017). Bakterinin gelişebildiği optimum sıcaklık 35-50°C arasında olup optimum pH 5.5-6.5 arasında değişebilmektedir. *Bacillus* spp.'nin spor oluşturan türlerinin, vejetatif hücrelerine göre bazı farklı özellikleri (yüksek sıcaklık, antibiyotik ve mide asidi dayanıklılığı) olmasından dolayı son yıllarda probiyotik olarak kullanılması dikkat çekmektedir. Geniş bir pH aralığında kararlı olan sporlar, düşük pH'ya sahip mideden geçerek ince bağırsağa çok sayıda canlı mikroorganizmanın ulaşımını sağlar (Aşan Özüsağlam, 2010; Cutting, 2011).

Doğada keşfedilen 100 *Bacillus* spp. içerisinde patojen özellik taşamayan birkaç türünün (*B. subtilis* var. natto ve *Bacillus coagulans* dahil), probiyotik olarak kullanımının insanların kullanımı için uygun olduğu bildirilmiştir (Urdaci ve ark, 2004; Nithya ve Halami, 2013).

Bacillus spp.'nin faydaları arasında, diğer probiyotik özelliği taşıyan mikroorganizmalarda da olduğu gibi; bağışıklık sistemini düzenlemesi, antimikrobiyel madde üretimi ve bağırsak mikrobiyotasını iyileştirme özelliği bulunmaktadır (Cutting, 2002; Tam ve ark, 2006). Antimikrobiyel madde sentezleyen *Bacillus*'lar; *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thruringiensis*, *B. Amyloliquifaciens*, *B. thermoleovorans* ve *B. licheniformis*'tir (Lisoba ve ark, 2006; Xie ve ark, 2009).

Probiyotik olarak *Bacillus*'ları içeren yemler ve gıdalar, genel olarak; hayvanlar için büyümeye yardımcı, insanlar için gıda takviyesi, su ürünleri için ise büyümeyi destekleyici veya hastalıklara karşı dayanıklılık sağlama gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Cutting, 2011).

Horowitz-Wlassowa ve Nowotelnow tarafından yapılan bir çalışmada *Lactobacillus sporogenes*, izole edilip tanımlanmış ve sonradan *B. coagulans* ile benzeyen nitelikler taşımasından dolayı *B. coagulans* olarak sınıflandırılmıştır (Aşan Özüsağlam, 2010). Buchanan ve Gibbons (1974), bakterinin, aerobik ya da fakültatif olan, laktik asit üreten, spor oluşturan ve katalaz üreten *Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılmasını belirtmişlerdir. Fakat bazı ticari ürünleri yine de

L. sporogenes olarak bildirilmektedir ancak bunların *B. coagulans* olarak tekrardan adlandırılması gerektiği belirtilmektedir (Vecchi ve Drago, 2006). Diğer taraftan *B. coagulans* bakterisi, hücrede endosporun meydana geliş yeri (*B. coagulans*'da terminal; diğer *Bacillus*'larda sentral veya subterminal), nitratı nitrite indirgeyememesi, sitokrom-c oksidazın olmaması gibi nedenlerden olayı diğer *Bacillus*'lardan farklılık göstermektedir.

B. coagulans, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından güvenli olarak belirtilmiş, GRAS (Generally Recognized as Safe) ve QPS (Qualified Presumption of Safety) listesindedir (EFSA, 2013). Yem katkı maddesi olarak sindirimi hızlandırma yöntemiyle hayvanların büyümesini ciddi bir biçimde arttırarak bağırsaktaki *Staphylococcus* ve *Escherichia coli*'den kaynaklanan enfeksiyonları engellemektedir (Aşan Özüsağlam, 2010). *B. coagulans* ısıya dayanıklıdır ve probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların niteliklerini göstermektedirler (Karri ve ark, 2016).

B. coagulans'ın bazı suşlarının, yüksek sıcaklıklarda, mide asitliğinde ve safra asitlerinin olduğu yerlerde bile canlılıklarını devam ettirdikleri bildirilmiştir. Bu niteliklere sahip suşların sindirim sisteminde canlı kalma ihtimalllerinin fazla olduğu bildirilmiştir (Endres ve ark, 2009).

Bacillus'lar antibiyotik ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel maddeler de salgılamaktadırlar. Bu maddeler genel olarak gıda, tıp ve biyolojik mücadelede kullanılmaktadır. Günümüzde birçok mikroorganizma antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. İzole edilen yeni mikroorganizmaların antibiyotik salgılaması ve geniş antimikrobiyel özelliğinin olması önemlidir (Perez ve ark, 1993).

B. coagulans tarafından oluşturulan ve bakteriyosine benzer bir madde olan koagulinin; *Listeria*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* gibi Gram pozitif bazı patojenlere, *B. clausii*'nin ürettiği antimikrobiyel salgıların ise *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium difficile*'e karşı inhie edici etki gösterdiği belirlenmiştir (Urdaci ve ark, 2004).

Listeria cinsi 6 türden oluşmaktadır. Bunlar; *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi, Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri ve Listeria ivanovii*'dir (Bell ve Kyriakides, 2005; Wagner ve McLauchlin, 2008). *Listeria* cinsi genomundaki düşük G+C oranına bakılarak Gram pozitif bakterilerde *Clostridium* cinsinin yan dalı olarak belirtilmektedir. Mikroskopta incelendiği zaman kısa basil yapıda (0,5 X 2,0 µm) görünen mikroorganizmalar spor oluşturmayan ve 20-25°C'de hareketli bir yapıya sahiptirler. Polar kamçılarından dolayı takla hareketi yaparak ilerleyebilmektedirler. Aerobik ve fakültatif anaerobik olacak şekilde gelişmektedirler. En iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık aralığı 30-37°C'dir fakat birçok bakteri çeşidinin tersine 4-10°C'de çoğalabilirler (Bell ve Kyriakides, 2005; Gasanov ve ark, 2005).

Listeria cinsi bakteriler glikoz fermentasyonu sonunda laktik asit meydana getirirler fakat H_2S üretmezler. Metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve katalaz reaksiyonları pozitif; üre, oksidaz ve indol eaksiyonları negatiftir. Esculin ve sodyum hippuratı hidrolize edebilirler. Ancak kazein, süt ve jelatini hidrolize etme yetenekleri bulunmamaktadır (Ekici ve ark, 2004). Üremeleri için en ideal pH aralığı 7.2-7.6'dır fakat pH'nın 4.1'e düştüğü zamanlarda da canlılığını sürdürebilmesi ve gelişebilmesi virulansı bakımından önemlidir. Çünkü bu bakterinin insanların midesinden geçerken ekstrem şartlara karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır (Cotter ve ark, 2000; McLauchlin ve ark, 2004).

Birçok çiğ, yarı işlemden geçen, pişirilmiş ve yemeye hazır üründe genel olarak gramda 10 mikroorganizmanın (kob/g) altında değerlerde tespit edilen *L. monocytogenes*'in kolaylıkla ürediği ürünlerin çoğunluğunda süt, yumuşak peynirler, işlenmiş sebzeler, sosis, pişirilmiş et ve kanatlı et, tütsülenmiş balık, deniz ürünleri yer almaktadır (Liu, 2008).

En riskli besinler yemeye hazır ve soğukta fazla depolanmış, dolayısıyla *L. monocytogenes* 'in gelişme gösterdiği gıdalar ile 100 kob/g 'dan daha çok *L. monocytogenes* içeren gıdalardır (Arachchi ve ark, 2013).

Gıdalar, *Listeria* türleri ile direk olarak bulaşabilmekte ayrıca gıdaların üretimi, paketlenmesi, depolanması, satışı ve tüketimi esnasında personel ya da enfekte malzemeyle ikincil yolla da bulaşabilmektedir. Yapılmış olan çalışmalarda, *Listeria* enfeksiyonlarının, genellikle gıdaların üretimi sırasında veya hayvanlardan ve çiftçilerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Ekici ve ark, 2004).

Et ve et ürünlerinin *Listeria* türleriyle bulaşmasına farklı faaliyetler neden olabilmektedir. Bulaşmada et işletmelerinin ve mezbahaların ciddi bir yeri bulunmaktadır. Bu işletmelerde hayvanların derileri, ayakları ve dışkılarından, ayrıca işletmede çalışanların elleri, elbiseleri ile kullanılan ekipmanlardan, çevreden ve işletmede kullanılan sulardan bulaşı olabilmektedir. Et ürünlerinin üretimi ve etin işlenmesi sırasında et işleme ve kesme aletleri de *Listeria*'ların bulaşı kaynağı olabilmektedir (Sancak ve ark, 2007).

L. monocytogenes önemli bir patojen olarak bilinmektedir. İnsanlarda deri ve mukoza lokalizasyonları, menenjit, septisemi, konjuktivit ve kan tablosunda monositoza sebep olmaktadır. Hastalık etkeni bulaşmış gıdaların kullanımı ile düşük miktarda *L. monocytogenes* kullanılması, sağlıklı yetişkin kişilerde herhangi bir hastalık belirtisine yol açmaz fakat bebek, yaşlı, hamile çocuk ya da bağışıklık sistemi bozulmuş olanların bu bakteriye karşı daha hassas olduğu bilinmektedir (Goulet ve ark, 2006). Fakat etkili olduğu hastalıkların düşük sıklıkla sağlıklı yetişkin insanlarda da gözlemlendiği belirtilmektedir. Bunun sebebinin kontamine gıda tüketimiyle fazla miktarda mikroorganizmanın kullanımı ileri sürülebilmektedir. Özellikle hamile kişilerde listeriozis enfeksiyonları, gribe benzer belirtiler göstermektedir ve plasenta aracılığıyla fetusa geçebildiği için erken sancı, ölü doğum, yeni doğan bebeğin erken ölümüne sebep olabildiği de gözlemlenmiştir. Ölüm oranı çok yüksektir, bebeklerde %50 ve diğer kişilerde en az %25'dir (Rhoades ve ark, 2009).

Listeriozis ile ilgili salgınları epidemiyolojik olarak pişmemiş sebzelerin kullanımı ile ilişkilidir. Genel olarak kullanıma hazır olan ve buzdolabı sıcaklığında fazla süre saklanan gıdalar en riskli olanlarıdır (Solmaz ve ark, 2007).

L. monocytogenes enfeksiyonları ile ABD'de her yıl yaklaşık 2500 kişi rahatsızlanmakta ve ortalama 500 kişi ölmektedir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010). Yıllar içinde görülmüş önemli listeriozis salgınlarına örnek; 1966 yılında Almanya'da süt ürünlerinin tüketiminden kaynaklı 279 olay ile %39 ölüm; 1976'da ABD'de çiğ salata tüketiminden dolayı 20 olay ile %25 ölüm; 1980 yılında Yeni Zelanda'da midye ve çiğ balıktan kaynaklı 22 olay ile %32 ölüm; 1980-1981 yılları arasında Kanada'da lahana salatasının tüketiminden kaynaklı 41 olay ile %34 ölüm; 1983 yılında Boston-ABD'de pastörize sütten dolayı 49 olay ile %29 ölüm; 1985'de Kaliforniya-ABD'de Meksika tipi peynir tüketimi sebebiyle 142 olay ile %21 ölüm; 1987-1989 yılları arasında İngiltere'de ciğer ezmesi kaynaklı 355 olay ile %26 ölüm; 1992 yılında Fransa'da domuz eti tüketiminden dolayı 279 olay ile % 32ölüm; 1998-1999 yılları arasında ABD'de sosisli sandviç ve şarküteri etlerinin kullanımından dolayı 101 olay ile %21 ölüm; yine ABD'de 2002 yılında tavuk ve hindi eti tüketimi kaynaklı 53 olay ile %21 ölüm görülmüştür (McLauchlin ve ark, 2004; Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

Biyofilm, cansız /canlı bir yüzeye geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak yapışmış kendi ürettikleri ekstraselüler matriks tarafından çevrelenmiş ve salgıladıkları sinyal maddeleri ile birbiri ile haberleşebilen mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır (Kam ve Seçkin, 2017; Ünal ve Tayfur, 2017). Matriksi oluşturan tabakanın, biyofilm katmanları içinde yer alan mikroorganizmalar tarafından üretilen ağ yapısı şeklinde jele benzer polisakkarit bir yapı olduğu bilinmektedir. Biyofilm tabakasının %97'sini su oluşturmaktadır. Geri kalan kısımlarda ise mikroorganizmalar, EPS (ekstraselüler polimerik maddeler), proteinler, nükleik asit, lipit ve fosfolipitler yer almaktadır (Gün ve Ekinci 2009; Ünal ve Tayfur, 2017).

Mikroorganizmalar tarafından biyofilm tabakasının oluşturulma nedenleri aşağıdaki gibidir (Jefferson, 2004);

1. Dış faktörlerden korunmak,
2. Besin maddelerine erişebilme imkânını artırmak,
3. Diğer mikroorganizmalar ile iletişim halinde olarak, topluca hareket etmek
4. Diğer mikroorganizma grupları ile sinyal molekülleri ile haberleşerek, ortam koşullarına uygun olacak şekilde yeni ve farklı genetik özellik ve davranış şekilleri sergileyebilmek.

Biyofilmlerin gıda üretim yerlerinde temizlik işlemlerine dayanıklılık göstermeleri en karakteristik özelliklerinden biridir. Ekzopolimerik matriks katmanının oluşturduğu fiziksel engel yüzünden dezenfektanların biyofilm içerisine geçişi engellenmektedir. Plazmidler üzerine kodlanan dayanıklılık genleri biyofilm hücrelerinde yatay geçiş yapabilmekte ve bu hücreleri antimikrobiyellere karşı dayanıklı hale getirebilmektedir. (Sylla ve ark, 2013).

Son zamanlarda yapılan farklı çalışmalar, basınç, pH ve sıcaklık gibi farklı çevresel stres yöntemlerine karşı çok dayanıklı olduğu bilinen *Listeria* çeşitlerinin ayrıca biyofilm meydana getirme ve ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) oluşturma kabiliyetinin bulunduğunu göstermektedir (Slama ve ark, 2013). Özellikle gıda işletmelerinde *L. monocytogenes* türünün farklı mikrobiyota içeren biyofilm içinde gelişim gösterdiği ve bunun besin bulaşılarının temel sebebini oluşturduğu yapılmış çalışmalarda bulunmaktadır. Bu sebeple *Listeria* türlerinin biyofilm meydana getirme kabiliyetleri gıda sanayisi açısından çok önemlidir (Guerrieri ve ark, 2009).

L. innocua ve *L. monocytogenes* türleri arasında benzerlik oranının yüksek olması, aynı ortamlardan izole edilmesi ve *L. innocua*'nın insan için patojen olmamasından dolayı, laboratuvar güvenliği açısından *L. monocytogenes* yerine *L. innocua* çalışmalarda tercih edilmektedir (Sorrentino ve ark, 2018).

Bu çalışmada da, işletmelerde yüzeye yapışan bakterilerin ortamdan tamamen uzaklaştırılamadığı koşullarda gıdanın kalitesi ve güvenliğini tehdit eden biyofilmlerin oluşumunun engellenmesi ve gıda bulaşılarının ortadan kaldırılması

amacıyla *L. innocua* kullanılarak, probiyotik özellikte olan *B. coagulans*'ın antilisterial ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyofilm Oluşumu ve Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi

Biyofilm, mikrobiyel olarak değişikliğe uğramış, yüzey veya birbirine tutunarak, matriks veya hücre dışı polimerik madde (Extracelluler polymeric substances-EPS) içerisine gömülü şekilde olan planktonik hücrelerden çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi bakımından oldukça farklı özellikte olan biyolojik bir oluşumdur (Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000; Sutherland, 2001; Donlan, 2002). Biyofilm meydana gelişi fazla aşamalı ve sağlam bir oluşumdur. (Assanta, 2000). Biyofilmdeki bakteriler, çevre şartlarına, serbest halde bulunan planktonik bakterilere göre daha fazla dayanıklıdırlar. Biyofilm yapısı, inhibe edici özelliği olan ısı, antibiyotik ve dezenfektana karşı koruyucu nitelik göstermektedir.

Biyofilmi etkileyen üç ana bileşen söz konusudur. Bunlar; bakteriyel hücreler, tutunma yeri ve çevresel ortam. Tutunma ortamının nitelikleri biyofilmin meydana gelişini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. O yüzden gıdanın temas ettiği yüzeyin kullanımında uygun malzemenin seçilmesi ciddi öneme sahiptir. Yüzey düzgünlüğü veya temizlenme gibi özellikleri bakterilerin belli bir ortama tutunmasını ve malzemenin hijyen durumunu etkileyebilmektedir. Yüzeyler ile mikroorganizmaların etkileşimleri laboratuvarlarda analiz edilmektedir fakat kontrollü ve tanımlı olarak değişik deneysel modellerle gıda üretim aşamasındaki biyofilm gelişiminin standardizasyonunun sağlanması gerekmektedir. Ek olarak gıda sanayinde *L. monocytogenes* biyofilmlerini kontrol altına alabilmek için gıda üretim makineleri ile mikroorganizma arasındaki ilişkinin net bir biçimde anlaşılabilmesi önemli olmaktadır (Van Houdt ve Michiels, 2010).

Biyofilmlerin sentezi ve bakterilerin yüzeye bağlanma düzeyi, bakteri çeşidi, bakteri hücre duvarı yapısı, hücre hareketliliği, bakteri miktarı, bağlandığı yüzeyin nitelikleri, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, ortamdaki besin ögelerinin içeriği ve sayısı veya iyon konsantrasyonu gibi birçok faktörle değişkenlik gösterebilmektedir (Arnold ve Silver, 2000; Lindsay ve ark, 2002). Çizelge 2.1.'de

biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörlere örnekler görülmektedir (Douglas, 2003).

Çizelge 2.1. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler (Douglas, 2003)

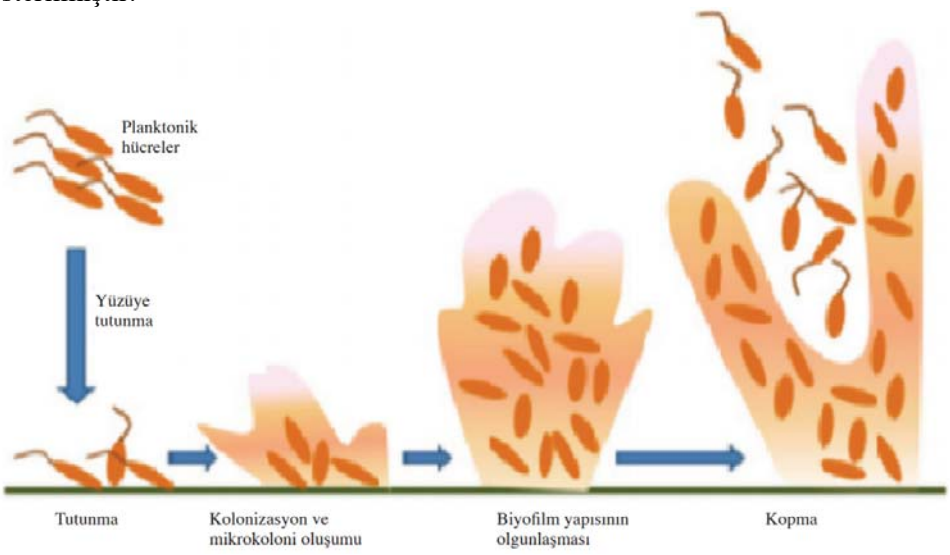
İÇ FAKTÖRLER	**DIŞ FAKTÖRLER**
Su aktivitesi (aw)	Yüzey materyali
Besin maddelerinden yararlanma	Yüzey alanı
Antimikrobiyel madde içeriği	Yüzey düzgünlüğü
pH ve asidite	Sıvının akış hızı
Elektriksel değişkenlik ve oksijen değişkeni	Sınırlı besin maddesi

Biyofilm yapılanması başlıca beş evrede meydana gelmektedir (Vuong ve Otto 2002; Post ve ark, 2004). Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tutunmalarıyla başlayarak gerçekleşen bir olaydır. Tutunma işlemi ile birlikte biyofilm tabakasının meydana gelmesini sağlayan genetik işlem başlatılır (Şahin, 2007). Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için öncelikle, bir yüzey ile ne zaman temas kurulması gerektiğini algılayabilmeleri gerekmektedir (Donlan, 2002; Şahin, 2007). Bakteriler, yüzeye yapışabilmeleri için meydana gelen uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla düzenleyici bir sisteme sahiptir. Bu sistem, bir alıcı bir de verici molekülden oluşmaktadır. Tutunma işlemini takiben, biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla farklılaşmanın başlaması, ‘‘quorum sensing’’ sistemi denilen başka bir haberleşme sistemine bağlı olarak devam etmektedir. “Yeterli çoğunluk” algılaması diye de isimlendirilen bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler.

Bir yüzeyde tutunmuş olan her bir bakteri, ortama mesaj verici bir molekül salgılamaktadır. Yüzeyde tutunan bakterilerin miktarları artarsa, bu sinyalin yerel konsantrasyonları da artmaktadır. Böylece, sinyal moleküllerinin

konsantrasyonundaki artışla beraber biyofilm oluşumu başlamaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığı ile iletişim sağlamaktadırlar (Şahin, 2007).

İkinci evre, yapışma olayından oluşmaktadır. Bu olay, bakterilerin yüzeye yapışma ya da şiddetli bir biçimde tutunma aşamasıdır. Üçüncü evrede, bakteriler mikrokoloniler şekline dönüşmektedirler. Dördüncü evrede ise, mikrokoloniler büyüyerek ve karmaşık yapılara veya kulelere dönüşürler (Şahin, 2007). En son olarak da, bakteri ya da bakteri kümeleri biyofilm katmanında koparak ortama yayılmaktadır. Bu ayrılma evresinde gerçekleşen olaylar, dış kuvvetlerin etkisiyle de olabilir, biyofilm oluşumunun bir parçası olarak da tek bir hücrenin ya da birçok hücrenin toplu şekilde kopmasıyla meydana gelebilmektedir (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2005; Şahin, 2007). Şekil 2.1'de biyofilmin oluşum aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları (Gupta ve ark, 2016)

Yapılan çalışmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye tutunmuş halde bulunan ve içinde mikroorganizmaların yer aldığı homojen bir katmandan oluşmadığını, bakterilerin belirli bir sisteme sahip ve koordinasyon kabiliyeti olan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu göstermektedir (Davey ve ark, 2000).

Biyofilmler bir yüzeye tutunarak kendilerinin salgıladıkları polimerik bir katman içerisinde yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği topluluk olarak tanımlanabilmektedirler. İn vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde oluşabilmektedir. Gıda maddelerinin ortamda olması ve nem miktarının fazlalığı biyofilmin meydana gelişini hızlandımaktadırlar (Akan ve Kınık, 2014).

Biyofilm gıda üretim yerlerinde başta çalışma yerleri olmak üzere, kullanılan makineler, ekipmanlar ve gıda üretim yüzeyleri gibi değişik yüzeylerde bulunabilir. Bakteriyel hücreler, biyofilmlerden besin maddelerine kolaylıkla geçebilmektedir. Bu yüzden patojen mikroorganizmaların sentezledikleri biyofilm, gıda sanayisi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca gıda üretim yerlerinde uygulanan rutin temizlik uygulamalarının biyofilmi ortadan kaldırmada yetersiz olduğu belirtilmektedir (Garrett ve ark, 2008).

Yapılan birçok çalışmada, gıda ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini etkileyen, gıda ile temas eden yüzeyler ve biyofilmlerde bazı gıda kaynaklı patojenlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Genellikle biyofilm ile ilişkili patojen salgınlarının *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* ve *Salmonella* spp., varlığı ile ilgili olduğu saptanmıştır (Lapidot ve ark, 2006; Aarnela ve ark, 2007).

Taze ve işlenmiş, bitkisel ve hayvansal gıdalarda birçok mikroorganizmanın gelişebildiği ve bunların bir kısmının insan sağlığına zararlı olduğu bilinmektedir (Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000). Gıda işletmelerinde; üretim, depolama, işleme yüzeyleri gibi gıda zincirinin önemli ana kontaminasyon kaynaklarında biyofilm oluşumunun önemli bir problem teşkil etttiği bildirilmektedir. Süt işletmelerinde en ideal çalışan CIP sisteminin varlığında bile cihaz ve ekipman yüzeylerinde mikroorganizma canlılığı ortaya konmuştur. Bu mikroorganizmaların kalıntı miktarına, sıcaklığa, bağıl neme bağlı olarak uzun süre kültüre edilemediği halde canlı halde kalabildiği bildirilmiştir (Chechowski, 1990).

Floyd ve ark (2003) yaptığı bir çalışmada kanatlı eti üretim yerlerinde, soğutma tankı ve haşlama tankında oluşan biyofilmden *E. coli*, *Salmonella* spp.,

S. aureus ve *C. jejuni* izole etmişlerdir. Kanatlı karkaslarının kontaminasyonunda haşlama ve soğutma tanklarının önemli olduğunu saptamışlardır.

L. monocytogenes ve *Salmonella* türleri, gıda üretim yerlerinde biyofilm oluşumuna ve gıdalar aracılığıyla kontaminasyona yol açabilen patojenik bakterilerdir (Aksu ve ark, 2011).

Yapılan bir çalışmada et fabrikalarında temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerini takiben gıda hatlarında bulunan konveyörlerden *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Listeria* spp., *Serratia* spp. ve *Staphylococcus* spp. türlerinin izole edildiği belirlenmiş ve biyofilm oluşturma koşulları ile dezenfektanlara karşı dirençleri araştırılmıştır. Denemede biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşların dezenfeksiyon işlemlerinden sonra bile ortamdan izole edilebilen bakteriler olan *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Listeria* cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun çapraz kontaminasyona neden olarak, tüketime hazır et ürünlerinde risk oluşturacağı ifade edilmektedir (Fagerlund ve ark, 2017).

Mezbahalarda dekontaminasyon için kullanılan trisodyum fosfat solüsyonlarından en fazla *E. coli* O157:H7, daha sonra sırasıyla *C. jejuni*, *S. typhimurium* ve *L. monocytogenes*'in etkilendiği belirtilmiştir. Sonuçta TSP'nin; enterik mikroorganizmalar için kanatlı işleme tesislerinde oda sıcaklığında %8'lik solüsyonlar halinde 10 dakika uygulanarak, dekontaminasyon için ihtiyaç duyulan biosit etkiyi gösterdiği belirtilmiştir. Aynı derişim ve sıcaklıkta *L. monocytogenes* için TSP uygulama süresinin daha fazla olduğu beliritilmiştir (Stopforth, 2000; Kreft ve Wimpenny, 2001). Bu çalışmalar, karkastan süzülen sularda bakteriyel yapışma için uygun koşulların sağlandığını ve soğutma süresinde karkas yüzeyinde biyofilm oluşabileceğini göstermektedir.

Biyofilm oluşumunun risk oluşturduğu alanlardan biri de su arıtma tesisleridir. Tesislerde yapılan mikrobiyel kontrollerde özellikle "şlam" oluşturan *Pseudomonas* ve bazı küf türlerinin izole edildiği belirtilmektedir. Biyofilm oluşumunu engellemek için etkin dezenfeksiyon sistemlerinin bulunması gerekliliği vurgulanmaktadır (Rao ve ark, 2017).

Bir diğer gıda kaynaklı patojen bakteri türü olan *S. aureus* ile yapılan bir çalışmada ise bakterinin ürettiği biyofilm gelişimi üzerine bazı bitki esansiyel yağlarının etkileri incelenmiştir. Özellikle *Cinnamomum cassia* ve *Salvia officinalis* esansiyel yağlarının beraber kullanıldığı denemede 24 saatlik inkübasyon sonunda *S. aureus* gelişiminin 3 log birimlik azaldığı ve biyofilm oluşumunun da 90 dakikalık muamelenin ardından %68 oranında azaldığı belirlenmiştir (Campana ve ark, 2017). Tarçın ve limon esansiyel yağları ile yapılan bir başka çalışmada *E. coli* ve *B. cereus* suşları arasında meydana gelen Quorum Sensing mekanizması engellenerek biyofilm oluşumunun azaldığı anlaşılmıştır (Kerekes ve ark, 2013). Biyofilm oluşumunu engelleyici yeni doğal koruyucu ajanların tespit edilmesi gıda endüstrisi açısından çok önemlidir. Nostro ve ark (2016)' nın yaptığı çalışmada *Punica granatum L.* ve *Rhus coriaria L.* bitki ekstraktlarının gıda kaynaklı patojenlerden olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm tabakalarını sırası ile %25-40 ve %20-30 arasında azalttığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu 96-kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar da ultrasonik ses dalgalarının *P. aureginosa* tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını parçalayabildiğini göstermektedir (Masak ve ark, 2014).

Yapılan bir çalışmada et fabrikalarında temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerini takiben gıda hatlarında bulunan konveyörlerden *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Listeria* spp., *Serratia* spp. *ve Staphylococcus* spp. türlerinin izole edildiği belirlenmiş ve biyofilm oluşturma koşulları ile dezenfektanlara karşı dirençleri araştırılmıştır. Denemede biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşların dezenfeksiyon işlemlerinden sonra bile ortamdan izole edilebilen bakteriler olan *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Listeria* cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun çapraz kontaminasyona neden olarak, tüketime hazır et ürünlerinde risk oluşturacağı ifade edilmektedir (Fagerlund ve ark, 2017).

2.2. *Listeria monocytogenes* ve Biyofilm Sentezleme Özelliği

Sebze ve meyveler, kırmızı et, et ürünleri, pişmiş sucuk-sosis, balık, deniz ürünleri, taze ve donmuş kümes hayvanları, pişmiş tavuk, hayvan kaynaklı pişmemiş gıdalar, çiğ ve pastörize edilmiş süt, peynir, dondurma, tatlı ve tuzlu su, lağım suyu, toz, toprak, hayvan yemi, gübre ve çürüyen bitkilerden, hayvanların ayaklarından elde edilebilmektedir. Ayrıca insanların ve hayvanların dışkısından da elde edilebilmektedir (Berktaş ve ark, 2006).

L. monocytogenes'in kanlı agarda 48 saat sonra oluşturduğu gri, küçük, damla benzeri koloniler beta-hemoliz zonu ile çevrili olacak şekilde görülmektedir (Kelen ve Lindsay, 1990). Nutrient agarda koloniler saydam, dışbükey; dikey ışıkta mavimsi gri; eğik ışıkta ise spesifik parlak mavi-yeşil görünürler. Yapışkan özelliği olduğundan, besiyerlerinden izolasyonları ve adlandırılmaları zordur. Genellike her besiyerinde kolaylıkla üreyebilmektedir fakat bazı B grubu vitaminlere (örn. biotin, tiamin, riboflavin, tioktik asit) ve aminoasitlere (örn; lösin, valin, sistein, glutamin,) ihtiyaç duymaktadırlar (Telli, 2012).

Besinlerde *L. monocytogenes*'in tespitinde 25 g numunede var/yok analizi yapılmaktadır. (Tunail, 2000; Hitchins, 2003). Bu durumda Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre gıdaların 25 g'ında
L. monocytogenes bulunmamalıdır. *L. monocytogenes* için en düşük enfekte edici doz tespit edilememiştir (Şanlıbaba ve Uymaz, 2015).

L. monocytogenes enfeksiyonlarında çoğunlukla beyaz peynirin rol oynadığı bildirilmiştir. Süt yağının koruyucu özelliğinin yanında, yüksek sıcaklık kısa zaman (HTST-High Temperature Short Time) uygulamalarının, kontrolsüz bir biçimde oluşturulması sonucu peynirlerde *L. monocytogenes*'in canlılığını koruduğu bildirilmiştir. Petran ve Zottola (1988) laboratuvar koşullarında pastörizatörlerden elde ettikleri *L. monocytogenes* ile yaptıkları çalışmada biyofilm oluşturma kabiliyetlerinin fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yüzeye yapışan bakterilerin tamamen ortamdan uzaklaştırılamadığı durumlarda gıda kalitesi ve güvenliğini olumsuz etkileyen biyofilm oluşturduğu

düşüncesiyle balık üretim tesisinde biyofilm oluşumu araştırılmıştır. *Listeria* spp.'nin tütsülenmiş alabalık ürünlerinde çapraz bulaşı ile bulunabildiği Autio ve ark (1999) tarafından belirtilmiştir. Balıkta bozulmaya neden olan *Shewanella putrefaciens*'in balık üretim aşamasında biyofilm oluşturma kabiliyeti gözlemlenmiştir. Etken maddenin tahta, çelik, karton ve plastik yüzeylere kolayca yapışıp, belirli sıcaklık ve nemde, 1-5 gün içerisinde, tek ve çok katmanlı biyofilm meydana getirerek, üretim aşamasında bulaşı kaynağı olarak kalıcılığını koruduğu saptanmıştır (Bagge ve Gram, 2000; Wong, 2003).

Bir çalışmada üretim ekipmanlarının yüzeyindeki gıda kalıntılarının *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Bu kalıntıların biyofilmin meydana gelmesi için gerekli miristik, stearik, oleik ve palmitik asitleri içerdiği tespit edilmiştir. Farklı gıdalarla yapılan bir çalışmada, hem sosisli sandviç hem de etli salataların hazırlandığı ortamlardan izole edilen *L. monocytogenes* ile kontamine sular, paslanmaz çelik ve plastik yüzeylere bırakılarak biyofilm meydana getirme potansiyelleri incelenmiştir. Sonuç olarak yüzeye ya da ürüne bağlı bir değişkenlik olduğu belirtilmiştir (Somers ve Wong, 2001).

Speranza ve ark (2009), starter olmayan laktik asit bakterilerinin, özellikle *Lactobacillus* spp.' nin, paslanmaz çelik yüzeylere yapışarak biyofilm üretmeleri ile, yumuşak peynir çeşitlerinde *L. monocytogenes'* in üremesini geciktirebileceğini belirtmişlerdir.

Ammor ve ark (2006), biyofilm üreten bazı laktik asit bakterilerinin (*Enterococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Vagococcus carniphilus* ve *Lactobacillus sakei*) et ürünlerinde bozulma etkeni olan ve patojen bakteriler üzerine (*Hafnia alvei* E1E-25, *L. innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* E1S-5) antibakteriyel özelliklerini incelemişler ve sonuçta *E. faecium* ve *V. carniphilus* türlerinin, *S. aureus*, *L. innocua* ve *H. alvei* üzerine en yüksek antagonistik etki gösterdikleri belirlemişlerdir.

Son zamanlarda tavuk sanayisindeki hızlı gelişmelere ve tüketimde artışa paralel olarak, besin zehirlenmeleri artmıştır. Tavuk eti ekonomik ve besleyici

olmasının yanında, üretimi ve özellikle kesme aşamasında hijyenik kurallara uyulmaması, kontaminasyonlar, az pişirme ve saklama hataları gibi nedenlerden dolayı *L. monocytogenes* ve çoğu patojen mikroorganizmanın önemli bir kaynağını oluşturmuştur (Çolak ve ark, 2008).

Gıdalar *Listeria* türleri ile hem doğrudan bulaşabilmekte hem de gıdaların üretimi, paketlenmesi, depolanması, satışı ve tüketimi sırasında personel veya enfekte malzemeyle ikincil yolla da bulaşabilmektedir. Yapılmış olan çalışmalar, *Listeria* enfeksiyonlarının, genellikle gıdaların üretimi ile çiftçi ve hayvanlardan kaynaklandığını göstermektedir (Ekici ve ark, 2004).

Dondurma miksinin depolama ve olgunlaştırma sıcaklığında patojen bakteriler çoğalabilirler. Özellikle bu bakterilerden +4°C'de gelişmesini sürdürebilen, soğuğa dayanıklı ve bazı durumlarda da pastörizasyon sıcaklığına dirençli bir mikroorganizma olan *L. monocytogenes* dondurma tüketicisi için diğer patojenlerden daha çok öneme sahiptir. Dondurmanın üretiminde kontaminasyona uğramış çiğ süt kullanımı, yanlış pastörizasyon ya da işlem sonrası bulaşılar *L. monocytogenes* bulaşısında etken parametreleri oluşturmaktadır. Bu nedenle, dondurmada *L. monocytogenes* bulunma ihtimali diğer patojenlere göre çok daha yüksek olmaktadır (Ağaoğlu ve Alemdar, 2004; Sergelidis ve Abrahim, 2009).

Çiğ tavukta yüksek oranda bulunan *L. monocytogenes* işlenmiş tavuk ürünlerinde canlı kalabilmesi ve dolayısı ile evde diğer gıdalara çapraz bulaşabilme ihtimali sebebiyle problemler teşkil etmektedir (Barbalho ve ark, 2005). Bu durum özel kontrol yöntemlerini gerektiren mikrobiyolojik bir risk oluşturmaktadır (Peccio ve ark, 2003).

Menendez ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada, İspanya'da keçi sütünden yapılan 24 peynir örneğinin 2 adetinde *L. monocytogenes* bulmuşlardır.

Listeria çeşitlerinin pH'nın 4.1'e düştüğü koşullarda da gelişmesi ve canlılığını devam ettirebilmesi virulansı bakımından önemlidir. Çünkü bu bakterinin insanın midesinden geçerken ekstrem durumlara direnç gösterebildiği belirlenmiştir (Cotter ve ark, 2000; McLauchlin ve ark, 2004). pH, yüksek veya

düşük sıcaklıklar, besin azalması, ozmotik basınç, toksik veya inhibitörlerin bulunması, antibiyotikler, bakteriyostatik veya bakterisidaller, *L. monocytogenes*'in gelişme oranını azaltan durumlar olarak ifade edilebilir (Walsh ve ark, 2001; Prazak ve ark, 2002; Chen ve ark, 2009).

L. monocytogenes'in modifiye atmosferde ve vakum altındaki gelişimi incelendiğinde vakumlu ortamın ve modifiye atmosferdeki %40 oranında bulunan CO_2'in gelişimi etkilemediği, hatta %70 oranındaki CO_2'in de, ortamda %5 oksijen bulunması durumunda, gelişimi engellemediği tespit edilmiştir (Tunail, 2000).

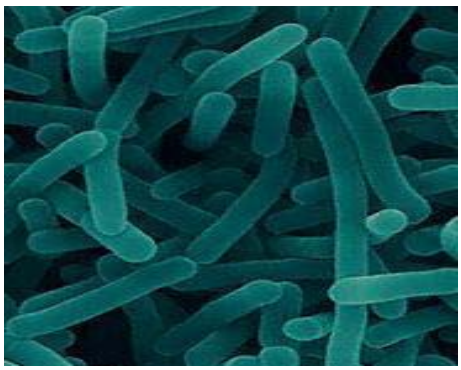
Pişmiş sığır etinde, karaciğer ve Bologna tipi sosislerde sodyum laktat; hindi eti ürünlerinde sodyum diasetat; kerevit kuyruğu eti homojenatında monolaurin ve laktik asit, dilimlenmiş sığır eti dokularında trisodyum fosfat gibi bileşikler; *L. monocytogenes*'e karşı antilisterial etkisi tespit edilmiştir (Patel ve ark, 2009).

Tavuk etinden yapılan burger örnekleri ile bir çalışmada, bu ürünlere sodyum laktat eklenmesinin antilisterial etki gösterdiği ve %2.5 sodyum laktat ilavesinin *L. monocytogenes* gelişimini tamamen engellediği gözlemlenmiştir (Cubina ve Mascort, 1999).

Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinlerin, *L. monocytogenes*'in gelişmesini inhibasyona uğrattığı belirtilmektedir (Patel ve ark, 2009). Yapılmış olan bir çalışmada ilk *L. monocytogenes* miktarı 4.4 log kob/ mL olan sütte 125 IU nisin kullanılmasının 6 saat gibi kısa bir sürede patojen miktarında 4 log birimlik bir azalma sağladığı ve bu süre sonucunda 0.4 log kob/mL *L. monocytogenes* bulunduğu saptanmıştır (Bhatti ve ark, 2004).

L. monocytogenes türü birçok antibiyotiğe karşı değişik derecelerde duyarlılık göstermektedir. Agar disk difüzyon yöntemine göre in vitro olarak *Listeria* izolatlarının Ampisilin, Karbenisilin, Sefaloridin, Kloramfenikol, Eritromisin, Furazolidon, Neomisin, Novobiosin, Oleandomisin, Tikasilin, Azlosilin'e duyarlı; Klortetrasiklin, Tetrasiklin, Oksitetrasiklin, Gentamisin, Kanamisin, Penisilin-G ve Streptomisin'e az duyarlı olmalarına kasın Kolitsin,

Sulfat, Nalidiksik asit, Polimiksin-B ve Sulfonamidler'e dirençli olduğu bildirilmiştir (Topcu, 2006). Şekil 2.2'de *Listeria monocytogenes'*in elektron mikroskobu görüntüsü yer almaktadır (Üney, 2016)



Şekil 2.2. *Listeria monocytogenes'*in elektron mikroskobu görüntüsü (Üney, 2016)

2.3. *Bacillus coagulans* ve Probiyotik Olarak Önemi

Asit üretebilmesine rağmen rafinoz, manitol, maltoz ve sükrozun fermentasyonu sonucunda gaz üretememektedir. Asit üretmesi nedeniyle süt ürünleri, meyve ve sebzelerde bozulma olaylarına sebebiyet verdiği belirtilmektedir (De Clerk ve ark, 2004). Fakat bu durumun tersine laktik asit ve bazı suşların da termostabil alfa-amilaz gibi diğer ürünleri üretmesinden dolayı endüstri açısından önemlidir (Batra ve ark, 2002; Yoon ve ark, 2002).

B. coagulans tarafından salgılanan ve bakteriyosin benzeri madde olan koagulinin; *Listeria*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* gibi Gram pozitif bazı patojenlere, *B. clausii*'nin ürettiği antimikrobiyel maddelerin de *S. aureus*, *E. faecium* ve *C. difficile*'e karşı inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır (Schlech, 1983 ve Schlech ve ark, 1988).

Hyronimus ve ark (2000) yapmış oldukları bir çalışmada, üç *B. coagulans* suşunun da pH 2.5 ve 3.0'da canlılıklarını devam ettiremediklerini belirlemişlerdir. Bunun tersine, yapılan bir başka çalışmada ise *B. coagulans* CNCMI-1061 suşunun, kanatlı hayvanlarda probiyotik olarak kullanıldığı zaman, vejetatif

hücrelerin canlılıklarını %50 oranında koruduğu belirlenmiştir. Bu yüzden, aside dayanıklılığın değişik *B. coagulans* suşlarında değişkenlik gösterebileceği sonucu çıkarılmıştır (Adami ve Cavazzoni, 1993).

Mikroorganizmaların spor oluşturan yapıları, olumsuz çevre koşullarına vejetatif hücrelere göre çok fazla dirençli olduğu bilinmektedir. Bu özellikleri nedeniyle sporlar çok daha uzun zaman canlılıklarını sürdürebilmektedirler (Sanders ve ark, 2001). Kanatlı hayvanlarda probiyotik olarak kullanılma amacıyla liyofilize hale getirilen *B. coagulans* CNCM I-1061 suşunun ($0.5x10^{11}$ kob/g (%50 spor içeren)) 5 yıl sonrasında spor içeriği değişmezken vejetatif hücre sayısının %20-30 azaldığı yapılan bir çalışma ile tespit edilmiştir (Adami ve Cavazzoni, 1993).

*B. coagulans'*ın spor oluşturan yapılarının dış tabakası kalındır ve bu nedenle aside, kimyasallara, sıcağa ve radyasyona dayanıklılığı yüksektir. Su ya da yemle beraber kanatlılara verildiği zaman ve ideal şartlarda (vücut sıcaklığı, asitliği, safra ve diğer salgılarda) spor oluşturan yapıları aktif vejetatif hücrelere dönüşebilmektedir. *B. coagulans*'ın spor oluşturan yapıları termostabildir. Peletleme sırasında ve depolama süresince canlılığını koruyabilmektedir. Ayrıca spor oluşturan yapıları, safra ve mide salgılarından etkilenmez ve canlılığını devam ettirerek bağırsağa ulaştığı zaman hızla biraraya gelmektedirler. Sindirim sistemine yerleştikten sonra laktik asit ve diğer antogonistik maddeler salgılayarak patojen bakterilerin gelişmesini engeller ve bağırsakta *L. acidophilus*'un gelişimine ortam sağlar. Fakat bağırsağın doğal mikrobiyotası olmadığı için sporları (yarı konakçıl, semi-resident) vücuttan yavaşça atılmaktadır. Bu sebepten dolayı probiyotik olarak kullanıldığı zaman *B. coagulans*'ın hayvanlara günlük olarak verilmesi gerekmektedir (Anonim, 2007).

Probiyotiklerin mide ve safra asidine dayanıklı olması, bağırsak epitel hücrelerine yapışması gibi kriterleri haricinde potansiyel patojenik bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite göstermesi, işlenme ve depolanma boyunca canlılığını ve kararlılığını devam ettirebilmesi de gerekmektedir. Probiyotik etkili

mikroorganizmalarca bakteriyosinler, hidrojen peroksit, organik asitler ve yağ asitleri, gibi çeşitli antimikrobiyel maddeler de sentezlenmektedir. *B. coagulans* bakterisi farklı fekal bakteriler üzerine antimikrobiyel aktivite gösteren laktik asit üretmektedir (Bondi ve ark, 2000; Hyronimus ve ark, 2000). Farelerde, *B. coagulans*'ın, bağırsakta vankomisin dirençli *Enterococcus* sayılarını azalttığı belirlenmiştir (Donskey ve ark, 2001).

Sığır dışkısından elde edilen *B. coagulans* I4 suşunun, plazmid üzerinde kodlanan ve birçok patojen mikroorganizmalara karşı etkili olan coagulin adı verilen bakteriosin benzeri salgılar üretmesinden dolayı bazı *B. coagulans*'ların antimikrobiyel maddeler salgılaması suşa bağlı bir nitelik olarak da görülmektedir (Hyronimus ve ark, 1998).

Japonya'ya ait geleneksel bir gıda olan, *B. subtilis* (*natto*) kullanılarak, soya fasulyesinin fermantasyonuyla üretilen Natto'nun potansiyel probiyotik etkileri olduğu, bakterinin tek başına tüketilmesine göre soya ve bakterinin birlikte tüketilmesiyle daha fazla yarar sağlandığı bildirilmiştir (Hosoi ve ark, 2008; Cutting, 2011).

Konu ile ilgili yapılan farklı bir çalışmada, gastrointestinal sistemde de faydalı etkileri olduğu saptanan bir *B. subtilis* suşuna ait sporlar tam buğday bisküvisi üretiminde kullanılmış ve 235°C'de 8 dakika ısıl işlem sonrasında spor sayısında sadece 1 log düşüş olduğu saptanmıştır, dolayısıyla bu suşa ait sporların çeşitli gıda ürünlerinde probiyotik katkı olarak kullanılmasının mümkün olabileceği belirtilmiştir (Permpoonpattana ve ark, 2012).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Araştırmamızda, ticari olarak edilen probiyotik özellikteki *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) ve *Listeria innocua* (ATCC 33090) kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar

Araştırmada kullanılan besiyerlerinin özellikleri ve kullanım amaçları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Seyreltme sıvısı olarak NaCl (8.5 g/L), pepton (1.0 g/L) çözeltisi hazırlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanıp sterilize edilmiştir. Basit boyamada %4'lük kristal viyole ve boyaların çözündürülmesi için %95'lik etanol ve aseton (80:20) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	**Özellik**	**Kullanım Amacı**
Nutrient Agar (NA)	Merck, Hazır besiyeri	*B. coagulans*'ın sayımı
Nutrient Broth (NB)	Merck, Hazır besiyeri	*B. coagulans'ın gelişimi*
Tryiptic Soy Agar (TSA)	Merck, Hazır besiyeri	*L. innocua*'nın sayımı
Tryiptic Soy Broth (TSB)	Merck, Hazır besiyeri	*L. innocua*'nın gelişimi
Oxford *Listeria* Selektif Agar (OLSA)	Merck, Hazır besiyeri	*L. innocua*'nın sayımı

3.2.Metod

3.2.1.Stok Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Listeria innocua: Oxford *Listeria* Selektif Agar (Merck) besiyerinde gelişen kolonilerden öze ile koloni alınıp, her koloni 10 mL'lik %0.6 yeast ekstrakt ilaveli, TSB besiyerine inoküle edilmiş ve daha sonra bakteri kolonileri 37^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen bakteri kolonileri 5000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilerek, süpernatant dökülmüş ve 5 mL'lik eppendorf tüplerinde %40 oranında gliserol içeren TSB besiyerlerine kültürler alınarak, -18°C'de muhafaza edilmiştir (Koçan, 2007; Tatlı, 2009).

Bacillus coagulans : Araştırmada kullanılan *B. coagulans* NA besiyerine ekilerek tek koloni oluşturacak şekilde her bir koloni 10 mL NB besiyerine ekilerek 40°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gelişen kültürler santrifüj edilerek (5000 devir/dk'da, 10 dk, 4°C) üst faz uzaklaştırılmış ve 3 mL'lik eppendorf tüpleri içerisine 0.5 mL sıvı besiyeri, 0.5 mL çökelti ve 0.5 mL gliserol ilave edilerek -18°C'de muhafaza edilmiştir (Naranjo ve ark, 2013).

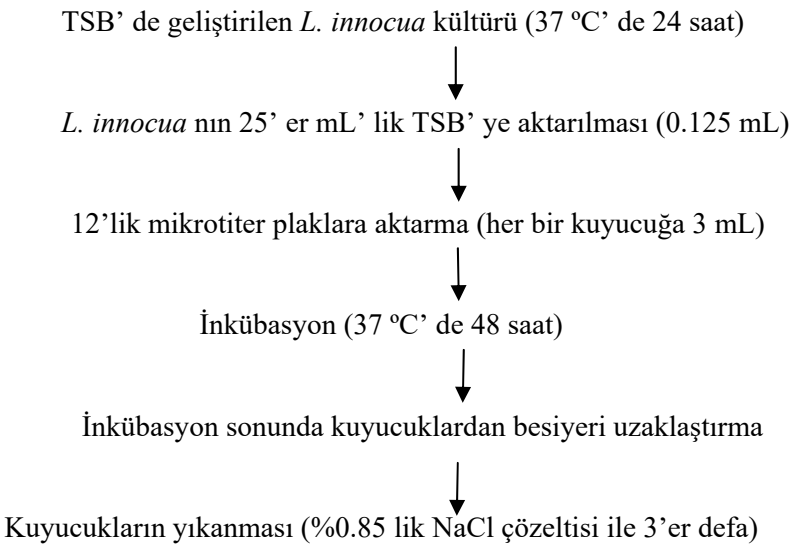
3.2.2. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antilisterial Özelliğinin Belirlenmesi

Agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak, *B. coagulans*'ın antilisterial özelliği belirlenmiştir. Stok kültür örneklerinden, öze ile *L. innocua*'a ait koloniler, TSB besiyerine inoküle edilmiş ve duyarlılık testi için inokülüm sayısı, McFarland 0.5 standart değerine ulaşana kadar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve yoğunluğu ayarlanan kültürlerden (10^6 kob/mL) 0.1 mL alınıp petrilerdeki steril TSA besiyerine ekilmiştir. Antilisterial etkiyi belirlemek için, NB besiyerinde 40°C'de 24 saat geliştirilen *B. coagulans,* inkübasyon sonrasında 5000 devir/dk'da, 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen üst faz üzerlerine 5'er mL saf su ilave edilip 3 kez yıkanarak 10^6 konsantrasyonda kültürler elde edilmiştir. Petri kabında bulunan *L. innocua* inoküle edilmiş TSA besiyerinden steril delgeç yardımıyla 1 cm çaplı diskler çıkarılarak her bir kuyucuğa 1'er mL *B. coagulans* saf kültürleri ve kültürün santrifüjlenmesi ile elde edilen üst faz ayrı ayrı olacak şekilde ilave

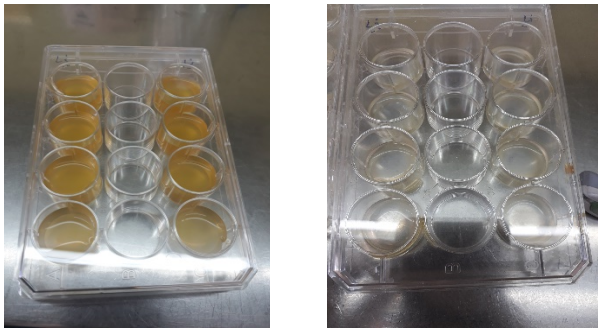
edilmiştir. Petriler, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında, kuyucukların etrafında oluşan berrak zon çapı ölçülmüş ve değerlendirme yapılmıştır (Facklam ve Sahm, 1995; Baştürk, 2005).

3.2.3. *Listeria innocua*'nın Biyofilm Sentezleme Özelliğinin Belirlenmesi

TSA besiyerinde üretilen ve geliştirilen *L. innocua* kültüründen bir koloni alınarak içerisinde 5 mL TSB bulunan tüplere inokule edilerek 37ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. TSB içinde gelişen kültürler (10^8) vortex ile karıştırıldıktan sonra 25'er mL'lik TSB'lere %0.5 (0.125 mL) *L. innocua* kültürü ilave edilmiş ve buradan da 12 kuyucuklu plaklara 3'er mL ilave edilmiştir. Plağın bir sütununa kontrol olarak içinde *L. innocua* kültürü olmayan TSB eklenmiş ve plaklar 37ºC'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerleri plaklardan mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuk 3'er mL %0.85' lik NaCl çözeltisi ile 3'er defa dikkatlice yıkanmış ve planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır (Bondi ve ark, 2008). Şekil 3.1.a ve 3.1.b'de *L. innocua*'nın biyofilm sentezleme özelliklerinin belirlenmesi gösterilmiştir.



Şekil 3.1. a. *L. innocua* biyofilm sentezleme özelliğinin belirlenmesi (Bondi ve ark, 2008)



Şekil 3.1.b. *L. innocua* biyofilm sentezleme özelliği

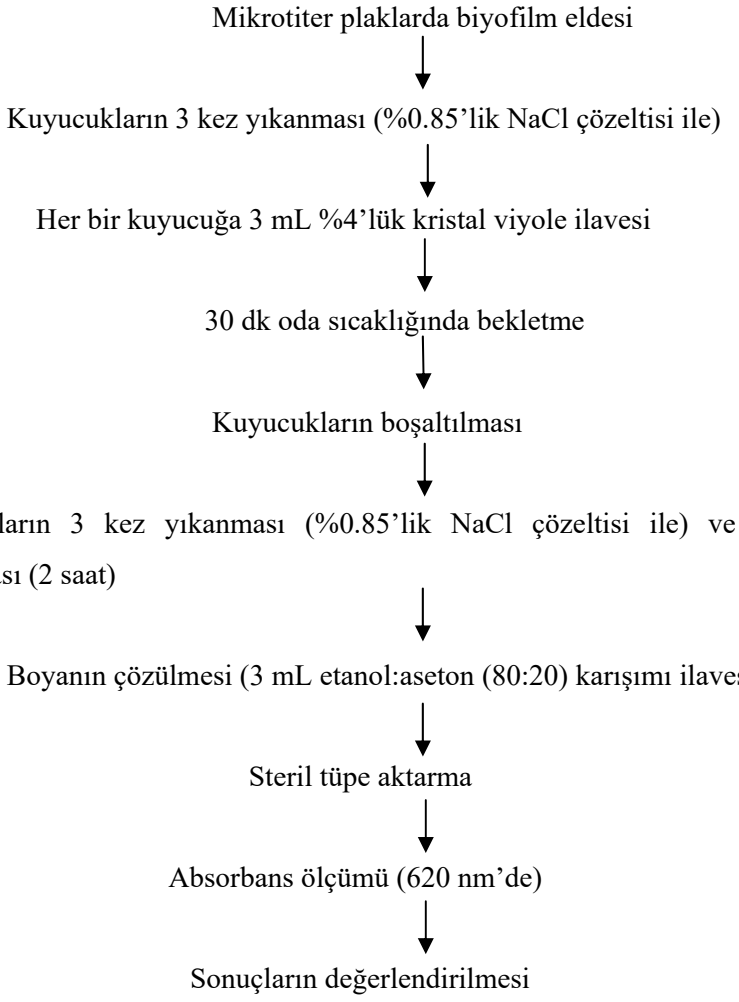
3.2.3.1. *Listeria innocua* Biyofilmlerinde Tutunan Hücre Sayılarının Belirlenmesi

L. innocua tarafından 12 kuyucuklu mikrotiter plaklarda biyofilm elde edilmiştir. Plaklardaki besiyerleri boşaltıldıktan sonra 3'er mL %0.85 lik NaCl çözeltisi (dilüsyon sıvısı) ile 3'er kez yıkanıp boşaltılarak her bir kuyucuğa 1'er mL dilüsyon sıvısı ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp biyofilmlerin çözelti içinde iyice süspanse olmaları sağlanmış ve daha sonra elde edilen süspansiyonlar içerisinde 9 ml steril dilüsyon sıvısı olan tüplere aktarılmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak, TSA besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılarak 37ºC' de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Bondi ve ark, 2008).

3.2.3.2. Biyofilm Doğrulama Testi

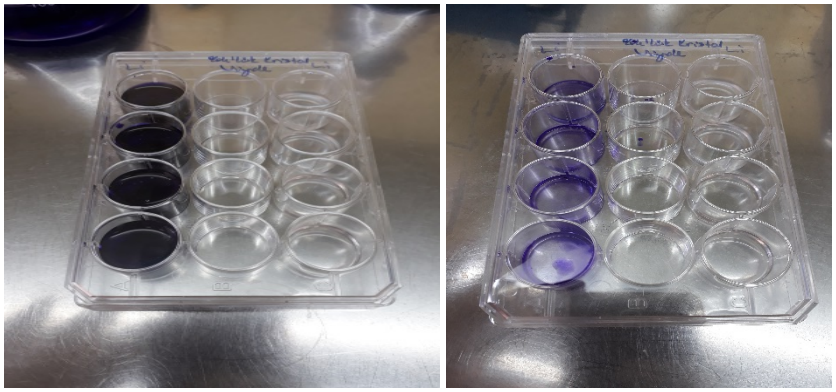
Doğrulama testinde *L. innocua*'dan 12 kuyucuklu mikrotiter plaklarda biyofilm elde edilmiştir. Biyofilmlerin elde edildiği her bir kuyucuğa 3'er mL %4'lük kristal viyole ilave edilip 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 3 kez 3'er mL %0.85'lik NaCl çözeltisi ile yıkanıp boşaltılarak 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş biyofimler üzerine etanol:aseton (80:20) karışımından 3 mL ilave edilip karıştırılarak 1 saat bekletilip biyofilmlerin çözülmesi sağlanmış ve elde edilen çözeltilerin spektrofotometrede 620 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar, absorbans >0.1 ise biyofilm pozitif, absorbans <0.1 ise

biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Kubota ve ark, 2008; Ünal Turhan ve ark, 2017). Şekil 3.2.a ve 3.2.b'de *L. innocua* tarafından üretilen biyofilm doğrulama testi gösterilmiştir.



Değerlendirme: Absorbans >0.1 = (+), Absorbans <0.1 = (-)

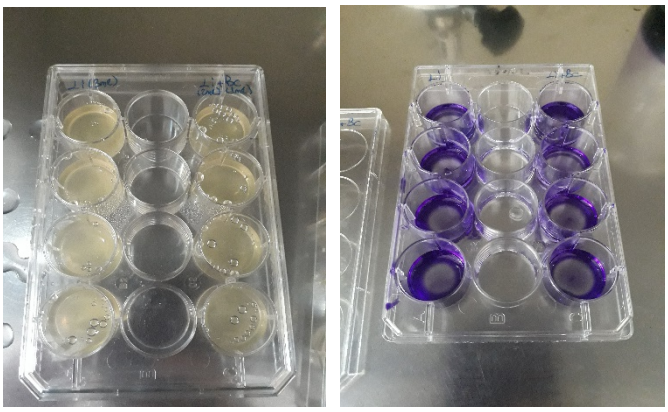
Şekil 3.2. a. *L. innocua* tarafından üretilen biyofilm doğrulama testi (Kubota ve ark, 2008; Ünal Turhan ve ark, 2017)



Şekil 3.2.b. *L. innocua* tarafından üretilen biyofilm doğrulama testi

3.2.4. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antibiyofilm Özelliğinin Belirlenmesi

Antibiyofilm testinde; 37ºC' de 24 saat TSB besiyerinde geliştirilen *L. innocua*'dan 2 mL ve 40ºC' de 24 saat NB besiyerinde geliştirilen *B. coagulans*'tan 1 mL alınarak 12 kuyucuklu mikrotiter plaklara ilave edilerek biyofilm elde edilmiştir. Biyofilmlerin elde edildiği her bir kuyucuğa Şekil 3.3.'te görüldüğü gibi 3'er mL %4'lük kristal viyole ilave edilip 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 3 kez 3'er mL %0.85'lik NaCl çözeltisi ile yıkanıp boşaltılarak 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş biyofimler üzerine, etanol:aseton (80:20) karışımından 3 mL ilave edilip karıştırılarak 1 saat bekletilip biyofilmlerin çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltilerin spektrofotometrede 620 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar, absorbans >0.1 ise biyofilm pozitif, absorbans <0.1 ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Kubota ve ark, 2008).



Şekil 3.3. *B. coagulans* bakterisinin antibiyofilm özelliği

3.2.4.1. Antibiyofilm Denemesinde Plaklara Tutunan *L. innocua* Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

L. innocua üzerine *B. coagulans* ilavesiyle 12 kuyucuklu mikrotiter plaklarda antibiyofilm elde edilmiştir. Plaklardaki besiyerleri boşaltıldıktan sonra 3'er mL %0.85 lik NaCl çözeltisi (dilüsyon sıvısı) ile 3'er kez yıkanıp boşaltılarak her bir kuyucuğa 1'er mL dilüsyon sıvısı ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp biyofilmlerin çözelti içinde iyice süspanse olmaları sağlanmış ve daha sonra elde edilen süspansiyonlar içerisinde 9 ml steril dilüsyon sıvısı olan tüplere aktarılmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak, Oxford *Listeria* Selektif Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekimler yapılarak 37ºC' de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Bondi ve ark, 2008).

3.2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, varyans analiziyle değerlendirilerek önemli olan değişikliklere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve bu nedenle "Windows SPSS 20.0 software" programı kullanılmıştır (Şentürk ve Özdamar, 2011).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

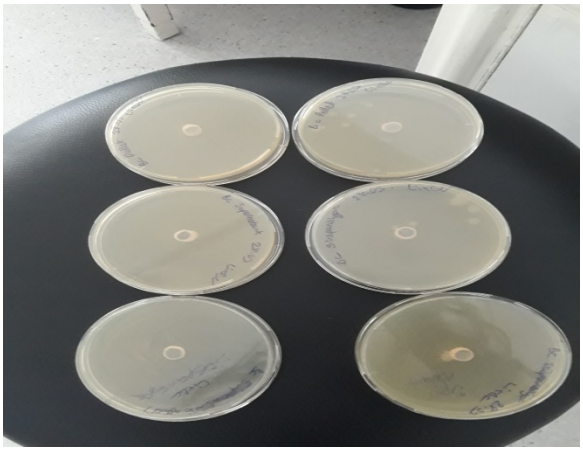
Araştırmada öncelikle *L. innocua'*nın biyofilm sentezleme özellikleri tespit edilmiş, daha sonra probiyotik *B. coagulans*'ın *L. innocua* üzerine antibiyofilm ve antilisterial etkisi araştırılmıştır.

4.1. Probiyotik *Bacillus coagulans*'ın Antilisterial Özelliğinin Belirlenmesi

B. coagulans'ın, *L. innocua* üzerine inhibisyon etkisi, hem üst faz hem de direk hücre süspansiyonu kullanılarak, agar kuyu difüzyon yöntemi ile inkübasyonun 48. saatlerinde incelenmiş fakat zon oluşumu gözlemlenememiştir (Şekil 4.1). Direnç mekanizması; mikroorganizma türleri, antibiyotik cinsi, insan ve çevrenin etkileşimi ile şekillenen karmaşık bir olgu olduğundan dolayı bazı bakterilerde doğal ya da sonradan kazanılmış direncin göz önüne alınması gerekmektedir (Gerritsen ve ark, 2011; Gad ve ark, 2014). *L. innocua* da biyofilm ürettiğinde çevreye karşı direnç kazanmaktadır. Bu sebepten dolayı *B. coagulans*'ın, *L. innocua* üzerine inhibisyon etkisi gözlemlenememiştir.

Benzer bir çalışma olarak Bondi ve ark, (2008), laktik asit bakterileri ile yapılmış ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen biyofilmin 10 günlük inkübasyon sonunda *L. monocytogenes'i* inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Douglas (2003), bakterilerin biyofilm ürettikleri zaman çeşitli antimikrobiyellere, endüstriyel biosit ve antiseptiklere daha dayanıklı oldukları, biyofilm bakterilerinin planktonik yapılarına göre, 10-1000 kat daha dayanıklı olduklarını bildirmişlerdir.



Şekil 4.1. *Bacillus coagulans'ın Listeria innocua* üzerine inhibisyon etkisi

4.2. *Listeria innocua*'nın Biyofilm Sentezleme Özelliğinin Belirlenmesi ve Canlı Hücre Sayımı

Denemelerde kullanılan *L. innocua* suşundan biyofilm elde edilerek doğrulama testleri yapılmış ve bu testin sonucunda *L. innocua* suşunun biyofilm ürettiği doğrulanmıştır.

L. innocua biyofilmlerinin %4 kristal viyole ilavesiyle 620 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.285±0.2 bulunmuştur. Absorbans değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşumunu göstermektedir. Bu durumda 48 saat sonunda 620 nm'de ölçümü yapılan *L. innocua*'nın biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Özellikle 24. saatten sonra biyofilm oluşumu organizmanın üreme döngüsü ve generasyon zamanı göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur.

L. innocua tarafından 12 kuyucuklu mikrotiter plaklarda biyofilm elde edildikten sonra tutunan hücre sayısı hesaplanmak üzere belirli seyreltmeler yapılarak ekim yapılmış ve 48 saat sonra biyofilme tutunan hücrelerin sayımı yapılmıştır.

Denemede *L. innocua* canlı hücre sayısı 5.08 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.1.'de *Listeria innocua* biyofilmlerinde tutunan canlı hücre

sayısı görülmektedir.

Çalışmamıza paralel olarak Djordjevic ve ark (2002) yaptıkları bir çalışmada, *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu mikroplak yöntemi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, standardize olmuş polyvinyl klorid mikroplakları (PVC) kullanarak *L. monocytogenes* suşlarının tutunmalarını kıyaslamışlardır. Toplam 31 *L. monocytogenes* suşunu plate kuyularında bulunan Welshimer's brothta 32^{o}C'de 20 ve 40 saatte üretmişlerdir. PVC mikroplak ile suşların daha hızlı ve basit olarak biyofilm oluşturduğu gözlemlemişlerdir.

Borucki ve ark (2003) ise, 80 farklı *L. monocytogenes* suşunun biyofilm üretme yeteneklerini araştırmış, bütün suşların biyofilm ürettiğini doğrulamış ve 595 nm' de ölçülen absorbans değerlerini 0.1 ile 2.2 arasında bulmuştur.

Dinçer ve Tutar (2017), *L. ivanovii* ATCC 19111, *L. innocua* 6a 33090, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *L. monocytogenes* ATCC 19111 suşlarının 6, 12, 24 ve 48 saat sonlarında biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemişlerdir. Buna bağlı olarak 6. ve 12. saatlerin sonucunda tüm suşların zayıf biyofilm meydana getirdiği gözlemlenmiş, 24. saat sonucunda *L. monocytogenes* ATCC 19111 suşunun orta dereceli, diğer suşların da yine zayıf biyofilm meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, 48 saatlik inkübasyon sonucunda biyofilm yapısının tüm örneklerde orta düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara benzer olarak, Gomez ve ark (2016)' nın yaptığı bir çalışmada ise *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes'*in hücrelerinin laktik asit bakterileri varlığında 24, 48 ve 72 saatte saf kültürlere göre oldukça azalma tespit etmişlerdir. *L. lactis'* in bulunduğu ortamda 48 saat sonunda *L. monocytogenes* canlı hücreleri hiç tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.1. *Listeria innocua* Biyofilmlerinde Tutunan Canlı Hücre Sayısı

Tutunan hücre sayısı	Biyofilm Oluşumu (+/-)	Canlı Hücre Sayısı (log kob/mL)
L. innocua	+	5.08

4.3. *Bacillus coagulans*'ın Antibiyofilm Özelliğinin Belirlenmesi ve Canlı Hücre Sayımı

Denemelerde kullanılan probiyotik özellikteki *B. coagulans*'ın *L. innocua* biyofilm oluşumunu önlediği tespit edilmiştir. Çizelge 4.2.'de *L. innocua* 'nın biyofilm sentezi ve *B. coagulans*'ın antibiyofilm özelliği görülmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçta *L. innocua* hücre sayısı 11.68±0.07 bulunurken; *L. innocua* üzerine doğrudan probiyotik özellikteki *B. coagulans* inokülasyonuyla hücre sayısı 5.04±0.78'e düşmüştür. Bu azalma, *L. innocua* gelişimi üzerine probiyotik *B. coagulans* bakterisinin inhibe edici etkisinin bulunduğunu göstermektedir. Hücre sayıları arasındaki sapma ve hücre sayısındaki azalmadaki sapma istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

48 saat sonunda 620 nm' de *L. innocua*'nın ölçülen absorbans değerleri 0.285±0.2'dır. Aynı şekilde 48 saat sonunda 620 nm' de *L. innocua* üzerine *B. coagulans* inokülasyonu sonucu ölçülen absorbans değerleri ise 0.073±0.17 olarak tespit edilmiştir. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Diğer yandan absorbans değerinin <0.1 olması ise *L. innocua* biyofilmi oluşumu üzerine probiyotik *B. coagulans*'ın biyofilm oluşumunu engelleyici özelliğinin bulunduğunu göstermiştir. Absorbans değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Üney (2016) 'in yaptığı benzer bir çalışmada da, probiyotik biyofilmler üzerine doğrudan %0.5-0.1 oranında *L. monocytogenes* inokülasyonu veya *L. monocytogenes* ve probiyotik kültür (*L. rhamnosus* veya *L. casei* Shirota) karışımının inokülasyonu *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşum oranı üzerinde 0.4-1.6 log kob/mL arasında düşüş meydana getirmiştir. En düşük inaktivasyonu ise *L. casei shirota* biyofilminin üzerine %0.5 *L. monocytogenes* ilavesi (0.4 log kob/mL), en yüksek inaktivasyonu *L. rhamnosus* biyofilminin üzerine %0.1 *L. rhamnosus* ve %0.1 *L. monocytogenes* ilavesi (1.6 log kob/mL) göstermiştir.

Çizelge 4.2. *L. innocua* 'nın Biyofilm Sentezi ve *B. coagulans*'ın Antibiyofilm Özelliği

	L. innocua **Hücre sayısı (log kob/mL)**	**Absorbans**	**Biyofilm**
L. innocua	11.68±0.07	0.285±0.2	+
***L. innocua* + *B. coagulans* hücresi**	5.04±0.78	0.073±0.17	-

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, *L. innocua'nın* 12 kuyucuklu mikrotiter plaklar kullanılarak biyofilm üretme özellikleri incelenmiş ve biyofilm ürettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, probiyotik özellikteki *B. coagulans*'ın *L. innocua* üzerine antibiyofilm ve antilisterial etkisi araştırılmış ve denemede kullanılan probiyotik *B. coagulans*'ın *L. innocua* üzerine antibiyofilm etki gösterdiği saptanmış fakat antilisterial etki saptanamamıştır.

Denemede kullanmış olduğumuz *B. coagulans*'ın, *L. innocua* üzerine inhibisyon etkisi, hem üst faz hem de direk hücre süspansiyonu kullanılarak, agar kuyu difüzyon yöntemi ile inkübasyonun 48. saatlerinde incelenmiş fakat zon oluşumu gözlemlenememiştir. Bu durum *L. innocua*'nın biyofilm yapısında bulundukları zaman antimikrobiyellere karşı daha dirençli olduklarını göstermektedir. *L. innocua*'nın biyofilm oluşumu engellenebildiği zaman direnç mekanizması ortadan kalkacak ve antimikrobiyel maddelere karşı tepki verebilecektir.

Denemelerde kullanılan *L. innocua* suşundan biyofilm elde edilerek doğrulama testleri yapılmış ve bu testin sonucunda *L. innocua* suşunun biyofilm ürettiği doğrulanmıştır. Özellikle 24. saatten sonra biyofilm oluşumu organizmanın üreme döngüsü ve generasyon zamanı göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur. Ortama *B. coagulans* ilavesiyle elde edilen sonuçlara göre *L. innocua* biyofilmi negatif olarak değerlendirilmiş olup *B. coagulans*'ın antibiyofilm etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuç, gıda işletmelerinde ana uğraş haline gelmiş olan biyofilm problemine çare olabilecek ve daha hijyenik koşullarda üretim yapılmasını sağlayabilecektir.

Çalışma farklı probiyotik bakteriler ve farklı patojenler kullanılarak genişletilmeli ve biyofilmlerin doğrudan veya dolaylı olarak kullanılmasıyla gıda güvenliği açısından doğal koruyucu olarak katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Aarnela, K., Lunden, J., Korkeala, H., Wirtanen, G., 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. Food Science and Technology,40:1041-1048.

Adami, A., Cavazzoni, V., 1993. Biomass production, preservation and characteristic of a strain of *Bacillus coagulans* usable as probiotic. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 11:93-100.

Ağaoğlu, S., Alemdar, S., 2004. Van'da tüketime sunulan dondurmalarda bazı patojenlerin varlığının araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van. Yüzüncü Yıl Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 15 (1-2):59-64.

Akan, E., Kınık, Ö.,2014. Psikrotrof Bakterilerin Çiğ Süt ve Süt Ürünleri Kalitesine Etkisi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir. Akademik Gıda Dergisi, 12(4):68-78.

Aksu F., Ünver A., Uran H.,2011. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumuna bağlı riskler. 7. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı 105s.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control, 17:454-461

Anonim, 2007. Lactospore http://www.vetcareindia.com/Probiotic. Erişim tarihi, 22.12.2007.

Arachchi, G.J.G., Mutukumira, A.N., Dias Wanigasekera, B.M., Cruz, C.D., Mclntyre, L., Young, J., Flint, S.H., Hudson, A., Billinton, C., 2013. Characterization of three listeriaphages isolated from New Zealand seafood environments. Journal of Applied Microbiology, 115:1427-1438.

Arnold, J.W., Silver, S., 2000. Comparison of poulty processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poultry Science, 79:1215-1221.

Assanta, M.A., 2000. The War against invasive bacteria that stick to surfaces. http://www.frd.gov.ca. Erişim tarihi, 16.12.2008.

Aşan Özüsağlam, M., 2010. Hayvan beslemede *Bacillus coagulans* bakterisinin probiyotik olarak önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5 (1):50-57, ISSN 1304-9984, Derleme.

Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A. M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., 1999. Sources of *L. monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-weld gel electrophoresis typing. Applied and Environmental Microbiology, 65:150–155.

Bagge, D., Gram, L., 2000. Adhesion and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* to food processing surfaces. http://dfu.min.dk. Erişim tarihi, 19.03.2003.

Barbalho, T.C.F., Almeida, P.F., Almeida, R.C.C., Hofer, E., 2005. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. Food Control, 16:211–216.

Baştürk, S., 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, İstanbul.

Batra, N., Singh, J., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R., Sobti, R.C., 2002. Production and characterization of a thermostable β-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. Biotechnology Applied Biochemical, 36:1-6.

Bell, C., Kyriakides, A., 2005. *Listeria* spp. a practical approach to the organism and its control in food. 2th edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing, chapter 1, 296p.

Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M., Güdücüoğlu, H., 2006. Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytoges*'in izolasyonu. Van Tıp Dergisi, 13(2):36-41.

Bhatti, M., Veeramachaneni, A., Shelef, L.A., 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. International Journal of Food Microbiology. 97:215-219.

Bondi, M., Messi, P., Danila, I., Marchioretto, D.I., 2000. Biological characteristics of LABLYS98, a *Lactobacillus sporogenes* for use as a probiotic compound. Industrie Alimentari, 39:704-710.

Bondi, M., Guerrieri, E., NiederHausern De, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., 2008. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. Food Control, (20):861-865.

Borucki, M.K., Krug, M.J., Muraoka, W.T., Call, D.R., 2003. Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray. Veterinary Microbiology, 92**:**351-362.

Brackett, R.E., 1988. Presence and persistence *L. monocytogenes* in food and water. Food Technology, p.162-164.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1268p.

Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., Baffone, W., 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. International Journal of Food Microbiology, 241:132–140.

Chechowski, M.H., 1990. Bacterial attachment to buna-N gaskets in milk processing equipment. Journal of dairy Technology, 45:113-114.

Chen, H., Neetoo, H., Ye, M., Joerger, R.D., 2009. Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* strains are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in CtsR. Food Microbiology, 26:404–408.

Cotter, P.D., Gaban, C.G.M., Hill, C., 2000. Analysis of the role of *Listeria monocytogenes* F 0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. International Journal of Food Microbiology, 60:137-146.

Cubina, I., Mascort, J., 1999. Lactate controls *Listeria monocytogenes*. Gıda, 4(5):25.

Cutting, S. M., 2002. *Bacillus* probiotics; spore germination in the gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 68:2344-2352.

Cutting, S. M., 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiology, 28:214-220.

Çolak, F., Dığrak, M., Aksoy, Z., 2008. Kahramanmaraş'ta tüketime sunulan tavuk etlerinde *Listeria* türlerinin patojenitesi'nin belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Mühendislik Dergisi, 11(1):8-12.

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

De Clerk, E., Rodriquez-Diaz, M., Forsth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., De Vos, P., 2004. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. Systematic and Applied Microbiolology, 27:50-60.

Dinçer, E., Tutar, U., 2017. *Listeria* standart suşlarının zamana bağlı biyofilm oluşturma kapasiteleri. Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sivas, s.1300-1949.

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

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infections Disease, 8:881-890.

Donskey, C.J., Hoyen, C.K., Das, S.M., Farmer, S., Dery, M., Bonomo, R.A., 2001. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant *Enterococci* in the stool of colonized mice. Letters in Applied Microbiolology, 33:84-88.

Douglas, L.J., 2003. Candida biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology, 11:30-36.

Düzgüneş, O., Kesici, T., Kacuncu, O., Gürbüz, F., 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları 2). Ankara üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 381s.

EFSA, 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). 11(11):34-49.

Ekici, K., İşleyici, Ö., Sağun, E., 2004. Süt ve süt Ürünlerinde *Listeria monocytoges* varlığı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (1-2):97-101.

Endres, J.R, Clewell, A., Jade, K.A., Farber, T., Hauswirth, J., Schauss, A.G., 2009. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. Food Chemical Toxicology, 47:1231-1238.

Facklam, R.R., Sahm, D.F., 1995. *Enterococcus*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Yolken, R.H. (eds) Manuel of Clinical Microbiology. Sixth edition. ASM Press. Waschington, p.308-315.

Fagerlund, A., Moretro, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S., 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 83(17):1-21.

Floyd, J.K., Gonpot, P., Smith, R., Richter, A., 2003. Regulation of alginate biosynthesis and biofilm formation. http://www.erc.montana.edu. Erişim tarihi, 19.11.2003.

Gad, G.F.M., Abdel-Hamid, A.M., Farag, Z.S.H., 2014. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. Brazilian Journal of Microbiology, 45(1):25-33.

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

Gasanov, U., Hughes, D., Hansbro, P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews, 29:851-75.

Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., de Vos, W.M., 2011. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes and Nutrition, 6:209–240.

Gomez, N.C., Ramiro, Juan, M.P., Quecan, B., Franco, B., 2016. Use of potential lactic acid bacteria (LAB) biofilm fort he control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Esherichia coli* O157:H7 biofilms formation, p.5-6.

Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E., De Valk, H., 2006. Surveillance of human listeriosis in France, 2001– 2003. Euro Surveillance, 11(6):79–81.

Guerrieri, E., De Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., Bond, M., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. Food Control, 20(9):861–5.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P,. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. Archieves of Microbiology, 198(1):1-15.

Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. Gıda, 34(3):165-173.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends Microbiology, 1: 7– 10.

Hitchins, A.D., 2003. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods bacteriological analytical manual online. http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam10.html. Erişim tarihi, 31.03.2009.

Hosoi, T., Kiuchi, K., 2008. Natto: A soybean food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In: Handbook of Fermented Functional Foods. Farnworth ER. (chief edition), CRC Press, Boca Raton, p.267-290.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Urdaci, M.C., 1998. Coagulin, a bacteriosin like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans*. Journal Applied of Microbiology, 85:42-50.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., Deschamps, A., 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61:193–197.

Ikeda, A., Kim, D., Hashidoko, Y., 2017. Identifcation of diacetonamine from soybean curd residue as a sporulationinducing factor toward *Bacillus* spp. AMB Express, 7:101.

Jefferson, K. K., Pier, D. B., Goldmann, D. A., Pier, G. B., 2004. The teicoplanin-associated locus regülatör (TcaR) and the intercellular adhesin locus regülatör (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*, Journal of Bacteriology, 186:2449-2456.

Jenkinson, F., Lappin-Scott, H.M., 2000. Biofilms adhere to stay. Trends Microbiology, 9:9-10.

Kam Hepdeniz, Ö,. Seçkin, Ö., 2017. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: oral biyofilm. Sdü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(3):47-55.

Karri, S. K., Majeed, M., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F., Pande, A., Majeed, S., 2016. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motılıty in wistar rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 7(1):311-316.

Kaynar, P., Beyatlı, Y., 2006. Balıklardan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(3):1-30.

Kelen, D.V., Lindsay, J.A., 1990. Differential hemolytic response of *Listeria monocytogenes* strains on various blood agar. Journal of Food Safety, 11:9-12.

Kerekes, E.B., Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvölgyi, C., Krisch, J., 2013. Antibiofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. Journal of Applied Microbiology, 115:933-942.

Koçan, D., 2007. *Listeria monocytogenes*'in belirlenmesinde minimum inhibisyon konsantrasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 177s.

Kreft, J.U., Wimpenny, J.W.T., 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. Water Science and Technology, 43:135-141.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. Journal of Bioscience and Bioengineering, 106:381-386.

Küçükçetin, A., Göçer, E. M. Ç., Ergin, F., Arslan, A.A., 2016. Farklı inkübasyon sıcaklığı ile inkübasyon sonlandırma pH'sının probiyotik yoğurdun fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi. Akademik Gıda, 14(4):341-350.

Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S., 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. International Journal of Food Microbiology, 109:229–233.

Lindsay, D., Brözel, V.S., Mostert, J.F., Von, Holy, A., 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. Journal of Applied Microbiology, 92:352–361.

Lisoba, M.P., Bonatto, D., Bizani, J.A., Henriques, Brandelli, A., 2006. Characterization of a bacteriocin like substance produced by *Bacillus amyloliquifaciens* isolated from Brazilian atlantic forest. International Microbiology, 9:111-118.

Liu, D., 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Pressby Taylor and Francis Group, LLC, USA, 552p.

Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhlid, R., Ananta, E,. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. Journal of Biotechnology, 162 (4):356-365.

Masak, J., Cejkova, A., Schreiberova, O., Rezanka, T., 2014. *Pseudomonas* biofilms possibilities of their control. FEMS Microbiology Ecology, 89:1–14.

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mögensen, G., Fönden, R., Saarela, M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal, 12:173–182.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis, a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology, 92:1533.

Menendez, S., Godinez, R., Centeno, J.A., Rodriquez-Otero, J.L., 2001. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of tetilla raw cows milk cheese. Food Microbiology, 18(2):151-158.

Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higuita, J. C., Cardona, C. A., 2013. Valorization of glycerol through the production of biopolymers. The PHB case using *Bacillus megaterium*. Bioresource Technology, 133:38–44.

Nithya, V., Halami, P., 2013. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. Annals of Microbiology, 63:129–137.

Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., Saraçoğlu, H.T., 2016. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. International Journal of Food Microbiology, 238:33–39.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek, 82 (1-4):279–289.

Patel, A.K, Ahire, J.J., Pawar, S.P., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B., 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. Food Resources International, 42:505-510.

Patel, J.R., Sanglay, G.C., Solomon, M.B. 2009. Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials and hydrodynamıc pressure processıng. Journal of Muscle Foods, 20:227–241.

Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plant. Letters Applied Microbiology, 37:234-238.

Perez, C., Suarez, C., Castro, G.R., 1993. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus* circulans cluster. Folia Microbiology, 38:25-28.

Permpoonpattana, P., Hong, H.A., Khaneja, R., Cutting, S.M., 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. Beneficial Microbes, 3(2):127-135.

Petran, R., Zottola, E.A., 1988. Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated milk cooling systems. Journal of Food Protection, 51:172-175.

Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Current Opinion Otolaryngol Head Neck Surgery, 12:185-190.

Prazak, A., Murano, E., Mercado, I., Acuff, G., 2002. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. Journal of Food Protection 65:1796–9.

Rao, T.S., Kumar, R., Balamurugan, P., Vithal, G.K., 2017. Microbial fouling in a water treatment plant and its control using biocides. Biocontrol Science, 22(2):105-119.

Rhoades, J.R., Duffy, G., Koutsoumanis, K., 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. Food Microbiology, 26:357–376.

Sancak, Y.C., İşleyici, Ö., Sağun, E., 2007. Van'da tüketime sunulan bazı et ürünlerinde *Listeria monocytoges* varlığı. 18(1):93-99.

Sanders, N.E., Morelli, L., Bush, S., 2001. *Lactobacillus sporogenes* is not a *Lactobacillus* probiotic. ASM News, 67:385-386.

Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2:101-110.

Schlech, W.F., Lavique, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, A.J., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., Kinh, S.H., Nicolls, E.S. ve Broome, C.V., 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. The New England Journal of Medicine, 308:203-206.

Schlech, W.F., 1988. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Technology, 42:176-178.

Sergelidis, D., Abrahim, A., 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control, 20:1–10.

Slama, R.B., Kouidhi, B., Zmanta, T., Chaieb, K., Bakhrouf, A., 2013. Antilisterial and antibiofilm activities of potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from Tunusian traditional fermented food. Journal of Food Safety, 33:8-16.

Solmaz, L., Çetinkaya, F., Soyutemiz, G.E., 2007. İhracata yönelik üretilen bazı gıdalarda *Listeria monocytogenes* varlığının araştırılması, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 33(2):1-11.

Sorrentin, E., Tremonte, P., Succi, M., Iorizzo, M., 2018. Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model. 9:1373.

Sömers, E.B., Wong, A.L., 2001. *Listeria monocytogenes* biofilm formation in ready to eat (RTE) meat processing envoironments. http://www.wisc.edu.

Erişim tarihi, 12.12.2002.

Speranza, B., Sinigaglia M., Corbo, M.R., 2009. Non starter lactic acid bacteria biofilms: A meansto control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. Food Control, 20:1063-1067.

Stopforth, J.D., 2000. Biofilm formation of acid adapted *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in diluted organic acid meat decontamination washings. http://www.csu.edu. Erişim tarihi, 01.04.2003.

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

Sylla, Y., Faille, C., Benezech, T., 2013. Removal kinetics of *Bacillus cereus* biofilms from food equipment cleaned in place, www.icef11.org/content/papers/hdo/HDO1271. Erişim tarihi, 12.11.2013.

Şahin, R., 2007. *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 71S.

Şanlıbaba, P., Uymaz, B., 2015. Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in biyokontrolünde faj uygulaması. Akademik Gıda, 13(1):81-88.

Şentürk, U., Özdamar, A., 2011. Modelling the interaction between water waves and the oscillating water column wave energy device. Mathematical and Computational Applications, 16(3):630-640.

Tatlı, D., 2009. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibyotik dirençlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 69s.

Telli, N., 2012. *Listeria monocytogenes*'in salamura beyaz peynir üretim hattında kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve PFGE metodu ile genotiplendirilmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, 121s.

Topcu, S., 2006. Ankara'da satışa sunulan döner kebap çeşitlerinden *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* izolasyonu ve çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsi, Ankara, 32s.

Tunail, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, 3.Bölüm, 4.Kısım. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara, 522s.

Urdaci, M.C., Bressollier, P., Pinchuk, I., 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. Journal of Clinical Gastroenterology, 38 (6):86-90.

Ünal, D., Tayfur, M. 2017. Biyofilm. Güncel Gastroenteroloji, 21(2): 108-114.

Üney, M.H., 2016. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus* shirota ve *Lactobacillus rhamnosus'*un biyofilm üretimlerinin prebiyotik katkılarla optimizayonu ve *Listeria monocytogenes* üzerine antibakteriyel etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, s.27-37.

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

Vecchi, E., Drago, L., 2006. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or mislabelling. International Journal of Probiotic and Prebiotic, 1(1):3-10.

Vuong, C., Otto, M.., 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbial Infections, 4:481–489.

Wagner, M., McLauchlin, J., 2008. Biology. In Liu D. (Editions). Handbook of *Listeria monocytogenes*. New York, USA: CRC Press, p.3-25.

Walsh, D., Dutty, G., Sheridan, J., Blair, I., Mcdowell, D. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. Journal of Applied Microbiology, 90:517–22.

Wong, A.L., 2003. Bacterial adhesion and biofilm formation in food processing environments. http://www.wisc.edu. Erişim tarihi, 08.01.2003.

Xie, J., Rijun Z., Changjiang S., Yaoqi G., 2009. Isolation and characterization of bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LEB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. African Journal of Biotechnology, 8(20):5611-5619.

Yavuz, M., Korukluoğlu, M., 2010. *Listeria monocytoges*'in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 24(1):1-10.

Yıldıran, H., Kılıç, G.B., Karahan, A.G., 2017. Probiyotik mayalar ve özellikleri. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5(10):1148-1155.

Yoon, H., Lee, K., Kim, H.Y., Kim, H.K., Shin, D., Hong, B., Cho, H. 2002. Gene cloning and biochemical analysis of thermostable chitosanase (TCH-2) from *Bacillus coagulans* CK108. Bioscience, Biotechnology and Biochemical, 66(5):986-995.

ÖZGEÇMİŞ

17/03/1994' te Adana'da doğdu. İlk, orta, lise ve üniversite öğrenimini Adana'da tamamladı. 2012 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimine başladı.