

Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* Suşlarının  
Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle  
Değerlendirilmesi

Şeref İset

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Aralık 2016

Investigation of Biofilm Forming Ability of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*  
Strains Isolated from Different Food Samples and Evaluation by Electron Microscopic  
Techniques

Şeref İset

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biotechnology and Biosafety

December 2016

Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* Suşlarının  
Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle  
Değerlendirilmesi

Şeref İset

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. İlknur DAĞ

Bu Tez ESOGÜ-BAP tarafından 2015-910 numaralı proje ile desteklenmiştir

Aralık 2016

## ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şeref İset'in YÜKSEK LİSANS tezi "Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle Değerlendirilmesi" başlıklı bu çalışma jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç.Dr. İlknur Dağ

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye:** Doç. Dr. İlknur Dağ

**Üye:** Prof. Dr. Birhan Kunter

**Üye:** Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. İlknur Dağ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle Değerlendirilmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Şeref İset

İmza

20/12/2016

## ÖZET

Gıda kaynaklı hastalıklar, insan sağlığını her geçen gün daha fazla tehdit etmektedir. Biyofilm oluşumu, bu enfeksiyonların en önemli kaynaklarından biridir. Biyofilm, mikroorganizmaların bir yüzeye yapışması ve kendi ürettikleri ekstrasellüler matriks içine gömülmesi sonucu oluşturdukları organize komüniteler olarak tanımlanabilir. Gıda temas yüzeylerine patojenik mikroorganizmaların yapışması ve ardından biyofilm oluşturması gıda güvenliği açısından tehlikelidir.

*Salmonella* türleri ve *Listeria monocytogenes* gıda yoluyla bulaşan en önemli patojenik bakterilerdendir. Her iki bakteri de canlı ve cansız yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilm içindeki bakteriler, temizleme ve sanitasyon işlemlerine artan bir direnç gösterirler. Bu çalışmanın amaçları (i) çeşitli gıda örneklerinden izole edilen ve tanımlanan *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm varlığını araştırmak ve (ii) güçlü biyofilm üreten *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* suşlarının çeşitli endüstriyel yüzeyler üzerindeki adezyon ve gelişim yeteneklerini değerlendirmektir. Analiz için alınan 603 gıda örneği içinde 6 izolat *L. monocytogenes* ve 8 izolat *Salmonella* spp. olarak tanımlanmıştır. İzolatlar standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmıştır. Biyofilm tespitleri mikrotiter plak metodu ve tüp metodu ile belirlenmiştir. Test edilen tüm *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* suşları biyofilm üretmiş ancak *L. monocytogenes* suşlarında daha yüksek derecede biyofilm belirlenmiştir. Bu iki testin yanında, seçilen güçlü biyofilm üreten suşların altı farklı endüstriyel yüzey (mermer, granit, cam, tahta, plastik, çelik) üzerindeki adezyon ve biyofilm oluşumları da SEM ile tespit edilmiştir.

Ayrıca seçilen iki suşun biyofilm oluşum ve gelişimleri granit yüzeylerde ve beş inkübasyon periyodunda değerlendirilmiştir (2., 4., 6., 24. ve 48. saatler). Olgun biyofilm oluşumu 24 ve 48. saatlerde tespit edilmiştir. Granit, mermer, tahta ve cam yüzeyler, çelik ve plastik yüzeylere kıyasla daha yoğun biyofilm oluşturmuşlardır. Özellikle granit ve mermer yüzeyler biyofilm oluşumu için daha elverişli ortamlar olarak bulunmuşlardır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, *Salmonella* spp., *Listeria*, yüzey çeşidi

## SUMMARY

Human health is more threatened by food borne diseases day by day. Biofilm production is one of the most important source these infections. Biofilm is defined as an organise community, characterized by cells which are irreversibly attached to substrate or with each other. An adherence of pathogenic microorganisms to food contact surfaces and biofilm formation is dangerous with respect to food security.

*Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are important pathogenic bacteria, which are transmitted by food. It is known that both microorganisms may produce biofilm on biotic or abiotic surfaces. Bacteria in biofilms exhibit enhanced resistance to cleaning and sanitation. The aims of this study were (i) to investigate the biofilm existing of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* isolated and identified from variety food samples, (ii) to evaluate the adhesion and growth abilities on variety industrial surfaces of strong biofilm positive *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* strains by scanning electron microscope. Among the 603 food samples taken for analysis, a total of 6 samples were confirmed positive *L. monocytogenes*; 8 samples were confirmed positive for *Salmonella* spp. Isolates were identified by standard microbiological procedures. Biofilm detection was evaluated by microtiter plate assay and tube method. All tested *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* strains produced biofilm but strains of *L. monocytogenes* exhibited a higher ability of biofilm formation. Concominantly with these two methods, adhesion and biofilm formation of selected strong biofilm producing strains to six different industrial surface (marble, granit, glass, wood, plastic, steel) was also assessed by SEM.

In addition, biofilm formation and development of selected two strains were also evaluated on granite surfaces and at five incubation periods (2th, 4th, 6th, 24th and 48th). Mature biofilm formation was determined after 24 and 48 hours. Granite, marble, wood and glass surfaces presented higher intensity of biofilm, compared to the steel and plastic surfaces. Especially granite and marble are the surfaces in which we found to be the most convenient for the biofilm formation.

**Keywords:** Biofilm, *Salmonella* spp., *Listeria*, surface kind

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince gösterdikleri yakın ilgiyle, sabırla, anlayışla, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Doç. Dr. İlknur DAĞ'a

Bilgi ve tecrübeleriyle önerilerini sunan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Bükay Yenice GÜRSU'ya

Tezimin deneysel çalışmalarının ilgili kısımlarını gerçekleştirebilmem için laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren ve çalışmalarım süresince hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen değerli iş arkadaşlarım Arif İSKENDER, Erdoğan VARAN, Zehra OKÇU'ya

Laboratuvar çalışmalarımda ve tezimde bana yardımcı olan arkadaşlarım Kamil KEMİKLİ'ye, Tayfun ŞENGEL'e, Esmâ Yorulmaz OCAK'a

Tez çalışmamı 2016-910 no'luproje ile destekleyen ESOGÜ-BAP'a

Tüm eğitim hayatımda maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme

Teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>VI</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VII</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>VIII</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XIII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Salmonella spp.</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Tanımı .....	4
2.1.2. Ekolojisi .....	5
2.1.3. Sınıflandırılması .....	6
2.1.4. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri .....	6
2.1.5. Enfeksiyon aracı olan gıdalar .....	7
2.1.6. Patojenite ve tedavi .....	8
<b>2.2. Listeria monocytogenes</b> .....	<b>9</b>
2.2.1. Tanımı .....	9
2.2.2. Ekolojisi .....	9
2.2.3. Sınıflandırılması .....	10
2.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri .....	10
2.2.5. Enfeksiyon aracı olan gıdalar .....	11
2.2.6. Patojenite ve tedavi .....	12
<b>2.3. Biyofilm Tanımı ve Yapısı</b> .....	<b>14</b>
2.3.1. Biyofilm oluşum basamakları .....	15
2.3.2. Çoğunluk Algılama (quorum sensing) .....	16
2.3.3. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi .....	18
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Materyal</b> .....	<b>19</b>

## İÇİNDEKİLER (devam)

3.1.1. Kullanılan bakteriler .....	19
3.1.2. <i>Salmonella</i> türlerinin izolasyon ve tanımlamalarında kullanılan gereçler ve hazırlanışları.....	19
3.1.2.1. <u>Salmonella xpress2</u> .....	19
3.1.2.2. <u>Xylose lysine deoxycholate agar</u> .....	19
3.1.2.3. <u>Nutrient broth</u> .....	20
3.1.2.4. <u>Xylose lysine tergitol4</u> .....	20
3.1.2.5. <u>Triple sugar iron</u> .....	20
3.1.2.6. <u>Metil kırmızısı voges proskauer</u> .....	20
3.1.2.7. <u>Sitrat besiyeri</u> .....	20
3.1.2.8. <u>Üre broth</u> .....	21
3.1.2.9. <u>Lisin dekarboksilaz broth</u> .....	21
3.1.2.10. <u>Tryptone broth</u> .....	21
3.1.2.11. <u>Metil kırmızısı çözeltisi</u> .....	21
3.1.2.12. <u>Ortho nitrophenyl b-d-galacto-pyranoside</u> .....	21
3.1.2.13. <u>Kovacs ayıracı</u> .....	21
3.1.2.14. <u>Alfa naftol solüsyonu</u> .....	22
3.1.2.15. <u>%40'lık potasyum hidroksit solüsyonu</u> .....	22
3.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> türlerinin izolasyon ve tanımlamalarında kullanılan gereçler ve hazırlanışları .....	22
3.1.3.1. <u>Half-fraser broth</u> .....	22
3.1.3.2. <u>Fraser broth</u> .....	22
3.1.3.3. <u>Agar listeria according to ottaviani &amp; agosti</u> .....	22
3.1.3.4. <u>Tryptic soy broth</u> .....	22
3.1.4. Kullanılan referans suşlar.....	23
3.1.5. Kullanılan cihazlar .....	23
3.1.6. Taramalı elektron mikroskopik inceleme için kullanılan fiksatif ve materyallerin hazırlanışları.....	23
3.1.6.1. <u>Fosfat tampon solüsyonu</u> .....	23
3.1.6.2. <u>%2,5'luk gluteraldehit tespit solüsyonu (primer fiksatif)</u> .....	24

## İÇİNDEKİLER (devam)

3.1.6.3. %'1 lik ozmiyum tetraoksit tespit solüsyonu (sekonder fiksatif).....	24
<b>3.2. Yöntem.....</b>	<b>24</b>
3.2.1. <i>Salmonella</i> spp. izolasyonu ve tanımlaması.....	24
3.2.2. <i>Salmonella</i> spp. doğrulama testleri .....	26
3.2.2.1. <u>Glikozdan asit ve gaz reaksiyonu, laktozdan asit reaksiyonu, sükrozdan asit reaksiyonu, hidrojen sülfür reaksiyonu</u> .....	27
3.2.2.2. <u>Üre hidrolizi</u> .....	27
3.2.2.3. <u>Lizin dekarboksilasyon reaksiyonu</u> .....	27
3.2.2.4. <u>Voges proskauer</u> .....	27
3.2.2.5. <u>İndol testi</u> .....	28
3.2.2.6. <u><math>\beta</math>-galaktosidaz testi</u> .....	28
3.2.2.7. <u>Metil kırmızısı testi</u> .....	28
3.2.2.8. <u>Sitrat testi</u> .....	28
3.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> izolasyonu ve tanımlaması .....	29
3.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> doğrulama testleri.....	29
3.2.5. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması.....	30
3.2.6. Biyofilm oluşumunun tayini .....	30
3.2.6.1. <u>Tüp aderans metodu</u> .....	30
3.2.6.2. <u>Polistiren mikrotitre plakalardaki biyofilm oluşumları</u> .....	31
3.2.6.3. <u>Örneklerin farklı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumlarının taramalı elektron mikroskopik yöntemlerle hazırlanması</u> .....	32
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>34</b>
4.1. <b>Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen <i>Salmonella</i> spp. ve <i>Listeria monocytogenes</i> Türlerinin Dağılımı.....</b>	<b>34</b>
4.2. <b>İzolasyonu Yapılan Suşların Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespiti.....</b>	<b>35</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>45</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Salmonella typhimurium</i> 'in Mikroskopik Görüntüsü.....	7
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Mikroskopik Görüntüsü .....	11
2.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	16
3.1. XLT-4 Agar Besiyerinde <i>Salmonella</i> spp. İzolatlarının Koloni Morfolojisi.....	25
3.2. ALOA Agar Besiyerinde <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının Zonlu Turkuaz Mavisi Renginde Koloni Morfolojisi.....	30
3.3. Cam Yüzeyler Üzerinde ve Farklı Zaman Aralıklarında <i>Salmonella</i> spp. ve <i>Listeria monocytogenes</i> Biyofilmlerinin SEM ile Görüntülenmesi Amacıyla Gerçekleştirilen Elektron Mikroskopik Takip İşlemleri .....	33
4.1. Çalışılan Yüzeylerin Kontrol Mikrografları. Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) yüzeyler (Mag x550) .....	36
4.2. <i>Salmonella</i> spp. S8 İzolatının 24. Saatlerde Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) Yüzeyler Üzerindeki SEM Görüntüleri (A, B, C, E Mag x2500; D-F Mag x5000) .....	37
4.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 13L İzolatının 24. Saatlerde Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) Yüzeyler Üzerindeki SEM Görüntüleri (A, B, C, D, E Mag x2500; F Mag x10000) .....	38
4.4. <i>Salmonella</i> spp. S8 İzolatının Granit Yüzeyler Üzerinde ve Beş Farklı Zaman Aralığında Gösterdiği Biyofilm Oluşumlarının SEM Görüntüleri (Mag x550).....	39
4.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 13L İzolatının Granit Yüzeyler Üzerinde ve Beş Farklı Zaman Aralığında Gösterdiği Biyofilm Oluşumlarının SEM Görüntüleri (Mag x550).....	40

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>3.1. <i>Salmonella</i> spp. İçin Uygulanan Biyokimyasal Testler.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen <i>Salmonella</i> spp. ve <i>Listeria monocytoges</i> Türlerinin Dağılımı ve Yüzdeleri .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Tüp Aderans Metodu ile İzolatların Gösterdiği Biyofilm Yüzdeleri .....</b>	<b>35</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
g	Gram
Kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
Rpm	Dakikadaki Dönüş Hızı
v/v	Hacim/hacim
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$a_w$	Su Aktivitesi

### Kısaltmalar

Abs	Absorbans
AHL / HSL	Açil-homoserin Lakton
ALOA	Agar Listeria According to Ottaviani & Agosti
ATCC	American Type Culture Collection
ÇA	Çoğunluğu Algılama ya da Quorum Sensing
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
ELFA	Enzim Bağlantılı Floresan Test
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PP5	Hidrofilik Kaplı Polipropilen

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
ISO	International Organization for Standardization
Mag	Magnifikasyon
MR-VP	Metil KırmızısıVoges Proskauer
ODc	Optik Yoğunluk Cut-off Değeri
OD	Optik Yoğunluk
ONPG	Ortho Nitrophenyl B-D-Galacto-Pyranoside
SX2	<i>Salmonella</i> Xpress2
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
CDC	The Centers for Disease Control and Prevention
TSI	Triple Sugar Iron
TSB	Tryptic Soy Broth
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
COV	Varyasyon Katsayısı (Coefficient of Variation)
VP	Voges Proskauer
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
XLT-4	Xylose-Lysine-Tergitol4

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gıda kaynaklı hastalıklar halen dünyanın en yaygın problemlerinden biridir. Bu hastalıklar zehirli bitkiler, ağır metaller ya da herbisidler gibi mikrobiyal kökenli olmayan etmenler nedeniyle olabildiği gibi, bakteri, virüs, mantar ve protozoa gibi mikrobiyal kaynaklı da olabilmektedir. Fakat en tehlikeli olanlar patojen mikroorganizmalardan ileri gelir. Oluşturdukları enfeksiyonlar orta dereceli gastroenteritlerden, hayatı tehdit eden nörolojik, hepatik ya da renal sendromlara kadar uzanabilmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu patojenlerin spektrumu oldukça geniştir ve çoğu da zoonotik orijindir. *Salmonella* türleri ve *L. monocytogenes* dünyada gıda yoluyla bulaşan en önemli patojenlerden olup hem gıda güvenliği hem de halk sağlığı açısından büyük bir risk oluşturmaktadırlar.

Yapılan çalışmalarda çoğu *L. monocytogenes* ve *Salmonella* suşunun canlı ya da cansız yüzeylere yapışabildiği ve biyofilm oluşturabildiği saptanmıştır. Bu patojenlerin gıda işleme sürecinde bir yüzey üzerine bağlanarak biyofilm oluşturabilme yetenekleri, onların hayatta kalmaları ve direnç oluşturabilmeleri açısından çok önemlidir.

Bilindiği gibi, mikroorganizmalar canlı veya cansız bir yüzeye yapıştığında glikokaliks adı verilen bir matriks içine gömülürler ve yavaş gelişen hücreler şeklinde çoğalırlar. Bu matriks içindeki hücreler kendilerine özgü bir fenotip oluşturacak şekilde bazı fizyolojik, metabolik ya da fenotipik değişimlere uğrarlar. Yapılan son çalışmalar biyofilmlerin sadece içinde mikroorganizma bulunan homojen tabakalardan ibaret olmadığını, aynı zamanda aralarında koordinasyon yeteneği bulunan çok fonksiyonel topluluklar olduklarını da göstermektedir. Biyofilm oluşum sürecinde, yüzeye tutunan bakterilerdeki EPS sentezi ile ilgili enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin ve değişen mikro çevreye uyumda etkin olan proteinlerin yapımı artar. Bunun sonucu olarak biyofilm yapısındaki bakterilerin fenotipleri, planktonik bakterilerden farklı ve antimikrobiallere çok daha dirençli bir hale dönüşür. Herhangi bir yüzey üzerinde biyofilm bir kez geliştiği zaman ortadan kaldırmak çok güçtür ve buldukları bölgeden yeni kolonilerle diğer alanlara yayılma potansiyelleri bulunmaktadır.



Biyofilm çok farklı yüzeyler üzerinde gelişebilir. gıda sektöründe de endüstriyel ekipmanlar, gıda işleme yüzeyleri, tezgâhlar ve araç gereçler üzerinde oluşabilirler. Bakteriyal hücreler biyofilmlerden gıda ürünlerine kolayca geçebildiklerinden patojen mikroorganizmaların oluşturabileceği biyofilm, gıda endüstrisi için çok önemli olmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde uygulanan rutin hijyen çalışmalarının biyofilmi ortadan kaldırmada yetersiz olduğu rapor edilmektedir. Çünkü biyofilm içindeki mikroorganizmalar desikasyon, ultraviyole ya da antimikrobiyal ve sanitasyon ajanlarına karşı dirençlidir. Bu sebeplerden dolayı *L. monocytogenes* ve *Salmonella* türlerinin biyofilmlerinin tespiti gıda güvenliği bakımından kritik önem taşımaktadır.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

*Listeria* cinsi içinde yalnız insanda patojen olan tür *L. monocytogenes*'dir (Tekay vd., 2014). Çevrede çok yaygın bir dağılım gösteren bu tür, buzdolabı sıcaklığında gelişebilen; soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilen bir patojendir. *L. monocytogenes* süt ve ürünleri, et ve ürünleri, turp, lahana gibi taze ürünler ile deniz ürünlerinden ve gıdaların hazırlandığı ortamlardan izole edilmektedir. Özellikle çiğ süt, önemli bir *L. monocytogenes* kaynağı olarak bilinmektedir. *Listeria*'nın çevreye yayılması sırasında enfekte hayvandan, toprak ve yemlerin bulaşmasına, buradan da et ve süt hayvanlarına tekrar geçiş şeklinde bir döngü göstermektedir. Böylece bulaşmış sebze, meyve, süt ve etten insanlara geçiş gerçekleşmektedir (Arda vd., 1999). Yol açtığı enfeksiyon Listeriozis olarak adlandırılır. Bulaşmış gıda tüketimi ile az miktarda *L. monocytogenes* alımı, sağlıklı yetişkinlerde herhangi bir klinik belirtiyeye yol açmazken, çocuk ve bebek, yaşlı, hamile, ilaç veya hastalık nedeniyle bağışıklık sistemi bozuk olan kişiler enfeksiyona daha duyarlıdır. Fakathastalık nadiren yetişkinlerde de görülebilmektedir (Goulet vd.,2006).

Mikrobiyal gıda zehirlenmeleri içinde dünyada en fazla görülen hastalıklardan biri Salmonellozis olup etkeni *Salmonella* türleridir (Türkyılmaz vd.,2007). Gıda maddelerinde çok az miktarda bulunmaları bile risklidir bu nedenle gıdalarda, içme ve kullanma sularında bu patojenin bulunmasına izin verilmemektedir. En fazla buldukları gıdalar hayvansal ürünlerdir. Özellikle kümes hayvanları eti, kırmızı et, kıyma, sosis, yumurta, su ürünleri, baharat, süt tozu ve krema *Salmonella* açısından önemli gıda maddeleridir. Yapılan çalışmalarda genellikle az pişmiş ya da çiğ yumurta, tavuk, et ve pastörize olmayan yiyecekler ile bulaştığı belirlenmiştir. Doğal yerleşim yerleri gastrointestinal sistem olduğu halde çevrede ve cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilirler. Buralarda çoğalamazlar ama hayvanlar veya insanların çevreye dışkılamasından sonra uygun koşullar altında suda haftalarca, toprakta yıllarca canlı kalabilir ve enfeksiyona kaynak oluştururlar. Salmonellozis gıdalarla alınan *Salmonella* organizmalarının bağırsaklarda üremesi ile meydana gelen ateşli bir gastroenteritis'tir (Kara, 2007).

Gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli kaynaklarından birisinin de biyofilmler olduğu belirtilmektedir. Biyofilmler bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilirler. *In vivo* olarak canlı hücrelerde veya *in vitro* olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilmektedir. Nem miktarının fazlalığı ve gıda maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu artırmaktadır (Akan ve Kınık, 2014). *L. monocytogenes* ve *Salmonella* türleri, gıda işleme yüzeylerinde biyofilm gelişimine ve gıdalarla çapraz bulaşmaya yol açabilen patojenik bakterilerdir (Aksu vd.,2011).

Biyofilm oluşumu üç ana bileşenin etkileşimine bağlıdır: bakteriyal hücreler, yapışma yüzeyi ve çevresel ortam. Yapışma yüzeyinin özellikleri biyofilm oluşumunu etkileyen önemli faktörlerdendir. Bu sebeple gıda temas ve işleme yüzeyinin düzenlenmesinde uygun materyalin seçimi büyük önem taşımaktadır. Yüzey pürüzlülüğü ya da temizlenebilirlik gibi özellikler bakterilerin belli bir yüzeye yapışmasını ve dolayısı ile materyalin hijyenik durumunu etkilemektedir. Yüzeyler ile mikroorganizmaların etkileşimleri laboratuvarlarda analiz edilmektedir ancak tanımlı ve kontrollü farklı deneysel modellerle gıda işleme sürecindeki biyofilm gelişiminin standardize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca gıda endüstrisinde *L. monocytogenes* ve *Salmonella* biyofilmlerini kontrol edebilmek için gıda işleme ekipmanı ile mikroorganizma arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir (Van Houdt ve Michiels, 2010).

## **2.1. *Salmonella* spp.**

### **2.1.1.Tanımı**

*Salmonella*'lar, *Enterobacteriaceae* familyasının üyesi olup Gram negatif, fakültatif anerob, çubuk şeklinde, *S. pullorum* ve *S. gallinarum* hariç, hareketli bakterilerdir (Poyraz ve Ören, 2015). Kendi içinde büyük bir grubun temsilcisidir. *Salmonella* A dan Z ye kadar (en çok karşılaşılan A, B, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F, G1, G2 gibi) gruplara ayrılmıştır. Ortak O antijenleri ile serovarlara ayrılır (Anonim a, 2016).

Geniş bir sıcaklık değeri aralığında üreyebilirler ve yüksek tuz konsantrasyonlarına duyarlıdırlar. Optimum üreme pH'ları nötr olup, pH 4,5'in altında gelişmeleri inhibe olur.

Spor ve kapsül yapısı oluşturmazlar. Optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C ve gelişme pH'ları 7, 4'dür (D'Aoust, 1997; Adams ve Moss, 1995).

*Salmonella* olarak tanımlanan ilk patojen üye *S. typhi*'dir. İlk kez 1880 yılında görülmüş, 1884 yılında ise Gaffky tarafından izole edilmiştir. 1885 yılında Salmon ve Smithy *S. choleraesuis*'i izole etmiş ve bu cinse *Salmonella* adı verilmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre gıdaların 25 g'ında *Salmonella* bulunmamalıdır. *Salmonella*'nın enfektif dozu 10<sup>6</sup> üzeri olarak bilinmektedir. Ancak yağ içeriği fazla olan gıdalarda enfektif dozun 10-100 bakteri olduğu tespit edilmiştir (Oktay, 2005).

### 2.1.2. Ekolojisi

*Salmonella*'ların primer kaynağı insan ve hayvanlardır. Taşıyıcı olan ve tedavi edilmeyen insanlar enfeksiyonların potansiyel kaynağını meydana getirmektedir. İnsan ve hayvanların dışkısı *Salmonella* kaynaklı enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynamaktadır. *Salmonella* türleri dünyada ve ülkemizde görülen önemli bakteriyel patojenler arasındadır (Deniz ve Ulukanlu, 2012).

*Salmonella* enfeksiyonunun yaygınlaşmasında sekonder bulaşma daha fazla önem taşımaktadır. Etmenin ağız ve beslenme sistemi ile insan vücuduna girmesine neden olan gıda maddesi sekonder olarak etrafı, alet ekipmanı, tabak, çatal, bıçak gibi mutfak malzemelerine bulaşmaktadır. İnsan eli primer bulaşmanın sekonder bulaşmaya çevrilmesinde büyük rol oynar. Bulaşmış gıda maddesine dokunan çıplak bir el, etmenin buradan sıçramasına ve her tarafa yayılmasına; insanlara, çevreye ve diğer gıdalara bulaşmasına neden olur. Bu şekildeki bulaşmaya çapraz (kros) bulaşma denmektedir (Halkman, 2013).

Patojenlerin çoğu gibi *Salmonella* spp. de vücut sıcaklığı olan 37 °C'yi tercih etmesine rağmen gelişme sıcaklıkları 2-54 °C'lere kadar uzanmaktadır. *S. typhimurium*'un kıymada 2 °C'de 24 saat içinde, tavuk kıymasında yine 2 °C'de 48 saat içinde, *S.*

*enteritidis*'in yumurta kabuğunda 4 °C'de 10 günden daha az bir sürede gelişebildiği belirlenmiştir. *Salmonella* spp. 'nin gıdada gelişmesi söz konusu olduğunda minimum gelişme sıcaklığının besiyerine oranla 2-4 °C daha yüksek olması gerekir. Saf kültür halinde düşük sıcaklıklarda kolaylıkla gelişebildiği halde, gıdada bulunan mikroflora içinde özellikle psikrofillerle rekabet edemediklerinden gelişimleri diğer mikroorganizmalar tarafından baskılanır. Özellikle laktik asit bakterilerinin oluşturdukları laktik asit ve bakteriyosin gibi metabolitlerle *Salmonella* gelişimi kolaylıkla engellenir. Dolayısıyla laktik asit fermantasyonu ve olgunlaşma süreci geçiren beyaz peynir ve sucuk gibi gıdalarda salmonellosis riski oldukça düşüktür (Halkman, 2013).

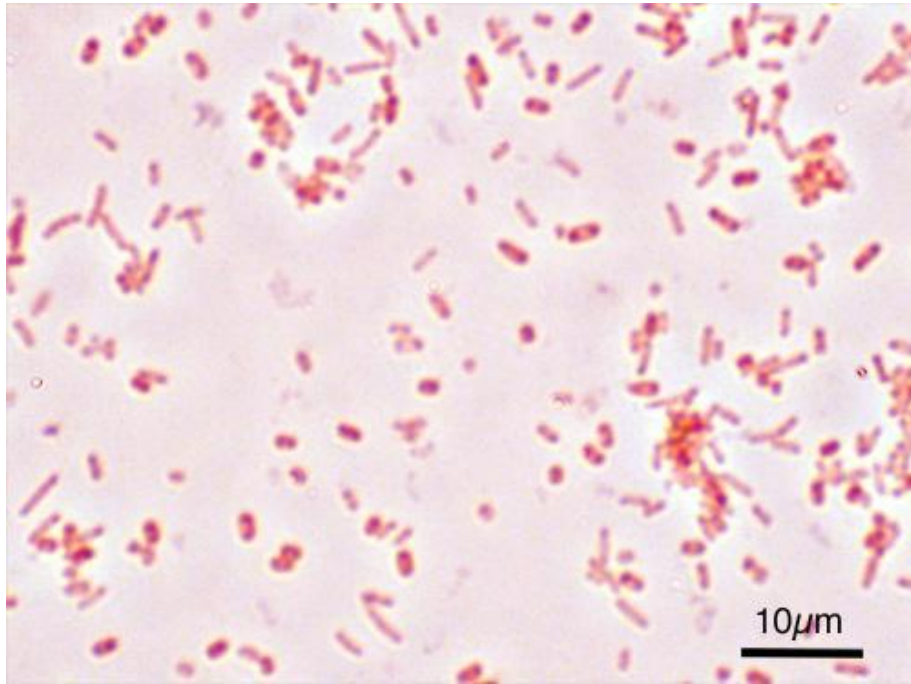
### 2.1.3. Sınıflandırılması

*Salmonella* cinsi içerisinde sadece insanlarda, hayvanlarda ve hem insanlarda hemde hayvanlarda enfeksiyon oluşturan birçok tür bulunmaktadır. Bu cins içinde 2500 serotip tanımlanmıştır (Akkaya ve Alişarlı, 2006). *Salmonella*'ların adlandırılması, diğer mikroorganizmalardan farklıdır. Standart adlandırmada cins ve tür ismi kullanılırken, tümü italik yazılır. *Salmonella* ise tümüyle serotipler ile ifade edilir. Buna göre serotip ismi büyük harfle ve italik olmadan yazılır (Halkman, 2013). Antijenik yapısında ise somatik (O), kirpik (H) ve yüzeysel (Vi, M, Fimbria) antijenleri bulunmaktadır. Somatik O antijeni bütün *Salmonella*'larda bulunmaktadır. Kirpik (H) antijeni hareketli olan bakterilerde bulunur. Vi antijeni tüm *Salmonella*'larda bulunmaz ve somatik antijenin dışında glikolipit yapısında bir antijendir. M antijeni ise mukoid koloni yapan bakterilerde bulunur (Lim ve Thnog, 2009; Mu-oz vd., 2010).

### 2.1.4. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

*Salmonella*'lar Gram negatif, genellikle 0,7-1,5 x 2-5 µm boyutlarında, çubuk şeklinde ve fakültatif anaerob bakterilerdir (Şekil 2.1). 37 °C'de ve 24 saatte çok fazla miktarda üreyebilmektedirler. Monosakkaritleri gaz oluşturarak fermente etmelerine rağmen, sakkaroz, laktoz ve salisini fermente edemezler. Üre negatiftirler. *S. Paratyphi*(A) hariç H<sub>2</sub>S (Hidrojen Sülfür) oluştururlar. En uygun nötr pH değerinde üremelerine rağmen pH 4'ün altı ve pH 9'un üzerindeki değerler bakterisidal etki göstermektedir. Çoğunlukla S tipi koloni yaparlar (Al-shadefat, 2011).

*Salmonella* spp. içingerekli olan en düşük  $a_w$  değerleri 0,93-0,96 arasındadır. Tuz *Salmonella* spp. gelişmesini engellemektedir. Ancak tuzun etkili konsantrasyonuhem sıcaklığa hem de gıdalara uygulanan işlemlere göre değişmektedir. Genellikle %3-4 tuz konsantrasyonu'nda *Salmonella* spp. inhibe olmaktadır (Halkman, 2013).



Şekil 2.1. *Salmonella typhimurium*'in Mikroskopik Görüntüsü (Anonim b, 2016)

### 2.1.5. Enfeksiyon aracı olan gıdalar

*Salmonella*'ların en fazla bulunduğu gıdaların başında hayvansal ürünler gelmektedir. Et, süt ve yumurta ile bunlardan hazırlanan ve yeterince ısıl işlem görmemiş gıdalar, kıyma, sosis, kanatlı eti, yumurta ürünleri, çeşitli soslar, su ürünleri, salatalar, dondurma, süttozu, krema, puding ve diğer süt ürünleri *Salmonella*'lar açısından risk taşıyan gıdalardır (Akkaya ve Alişarlı, 2006).

Yüksek asitli gıdalar haricinde tüm gıda maddelerinde *Salmonella* spp. bulunabilir. *Salmonella* bulaşmasında özellikle hayvansal ürünler büyük risk taşımakla birlikte lağım suyu veya lağım suyu ile kirlenmiş olan kaynak ve kuyu suları ile sulanan bitkisel ürünlerde risk oluşturmaktadır. Örneğin garnitür salata *Salmonella* bulaşması için bir risk kaynağıdır. Gıda işletmelerinde sanitasyon kurallarına yeterince uyulmaması durumunda gıdalar *Salmonella* ile bulaşmaktadır (Halkman, 2013).

### 2.1.6. Patojenite ve tedavi

*Salmonella* farklı klinik tablolar gösteren ve dünyanın her bölgesinde görülebilen enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bunlar tifoid *Salmonella* enfeksiyonları, enterik *Salmonella* enfeksiyonları, septisemik *Salmonella* enfeksiyonları ve lokal enfeksiyonlar gibi gruplar altında incelenebilir. Son yıllarda *Salmonella*'nın neden olduğu tifo insidansının azalmasına rağmen *Salmonella* gastroenteritlerinde artış olduğu görülmüştür (Sağlık Bakanlığı, 2015).

*Salmonella* spp.'nin neden olduğu hastalıklarda semptomlar hem ayrı ayrı hem de birbirini izleyerek meydana gelebilmektedir. Ayrıca bütün semptomlar aynı anda oluşup sendrom oluşturabilmektedir. (Halkman, 2013).

Hastalık kendini iştahsızlığa ek olarak, ateş ve karın ağrısı, daha sonra kusma ve pis kokulu ishale göstermektedir. Belirtiler 1-7 gün sürmektedir. Hastalığın şiddeti alınan bakteri sayısına ve kişinin direncine göre değişmektedir. Hastalığın toksik etkisi küçük çocuk (özellikle 5 yaş altındaki), yaşlı ve başka hastalığı olanlarda daha şiddetli olarak seyretmektedir. Ölüm oranı % 1'in altındadır. Laboratuvar tanısı için kan, idrar, dışkı, gıda maddeleri ya da kusmuk incelenebilir. Serolojik testlerde büyük önem taşımaktadır. Bu testler tifoid hastada antikorları göstermek amacıyla yapılır ( Al-shadefat, 2011).

Salmonellosis çoğunlukla gözle görülebilir bir iyileşme ile sonuçlanır. Ancak, hasta insan veya hayvan klinik bulgulara göre sağlıklı olarak değerlendirildiği halde canlı etmen henüz organizmadan tamamen uzaklaşmamış olabilir ve bağırsakların belli yerlerine, safrakesesi, karaciğer hatta böbrek gibi organların herhangi bir yerinde yerleşerek çeşitli salgılarla devamlı salgılanabilir. Enfeksiyonlarının çoğunda genellikle tedaviye gerek kalmaz. Bazen antibiyotik kullanımı ters etki bile yapabilir. Tedavide yalnızca vücut fazla su kaybettiğinden sıvı kaybı dengelenir ve elektrolitik denge düzenlenir (Halkman 2013).

*Salmonella*'lar, dünya'da ve ülkemizde önemli bakteriyel patojenler arasındadır. Bu patojenler nenden olduğu enfeksiyonları önlemek gıda endüstrisi ve kanatlı hayvanların sağlığı için önemlidir. İnfeksiyondan korunma yalnız iyi gözlemler ve kontrol programları ile başarılabilir (Ata ve Aydın, 2008).

## 2.2. *Listeria monocytogenes*

### 2.2.1. Tanımı

*L. monocytogenes*, Gram pozitif, fakültatif anaerob, kapsülsüz ve sporsuz bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C olup, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında gelişme gösterebilir. Peritrik flagellaları sayesinde 20-25 °C'de 24 saatlik kültürlerde aktif olarak hareket ederlerken, 37 °C'de hareketleri daha zayıftır. Halotolerant olup yüksek konsantrasyonlardaki tuz (% 10-12) varlığında bile çoğalabilirler (Norrung, 2000).

Bakteriye ilk olarak 1891 yılında alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmıştır. 1911 yılında hasta tavşanların karaciğerinde oluşan nekrotik odaklardan izole edilmiş ve *Bacillus hepatitis* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraları bu bakteriye *L. monocytogenes* adı verilmiştir (Gellin ve Broome, 1989). Kültürleri eskidikçe kokoid formdan uzun flamanlı şekillere kadar değişik şekiller gösterebilir. Son yıllarda *L. monocytogenes*'in neden olduğu Listeriosis vakalarının çok önem kazandığı rapor edilmektedir (Wang vd.,1992).

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

### 2.2.2. Ekolojisi

*L. monocytogenes*, doğal çevrede ve pek çok hayvansal ve bitkisel gıdada oldukça yaygın olarak bulunur (Fenlon vd.,1996). Tatlı su, tuzlu su, lağım suyu, toz, toprak, hayvan yemi, gübre ve çürüyen bitkilerden, hayvanların ayaklarından, hayvan kaynaklı pişmemiş gıdalar, taze ve donmuş kümes hayvanları, deniz ürünleri, kırmızı et, et ürünleri, balık, çiğ ve pastörize edilmiş süt, peynir, dondurma, pişmiş sucuk-sosis, pişmiş tavuk, çiğ sebze ve meyveler gibi geniş bir alandan izole edilebilmektedir. Ayrıca hayvanların ve insanların dışkılarından da izole edilebilmektedir (Berktaş vd.,2006).



### 2.2.3. Sınıflandırılması

Önceden *Corynebacteriaceae* familyası içinde bulunan *Listeria* cinsi, sonra *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus* grubuna eklenmiş, 2009 yılında yayımlanmış olan "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three" kaynağına göre en son olarak *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımı, *Listeriaceae* familyasına yerleştirilmiştir. Bu familya içinde *Listeria* ve *Brochothrix* cinsleri bulunur.

*Listeria* cinsi, 10 tür içermekte olup yalnız *L. monocytogenes* insan listeriozisi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak çok seyrek de olsa *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* kaynaklı listeriozis vakası da bildirmiştir. Somatik (O) ve ve flagellar (H) antijenlerin faktör antiserumları ile yapılan serotiplendirmede 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 olmak üzere *L. monocytogenes*'in 13 serotipi olduğu saptanmıştır. Özellikle 4b ve daha az olarak da 1/2a ve 1/2b serotipleri insan listeriozisine neden olan dominant serotipler olarak önem kazanmıştır (Koçan ve Halkman, 2006).

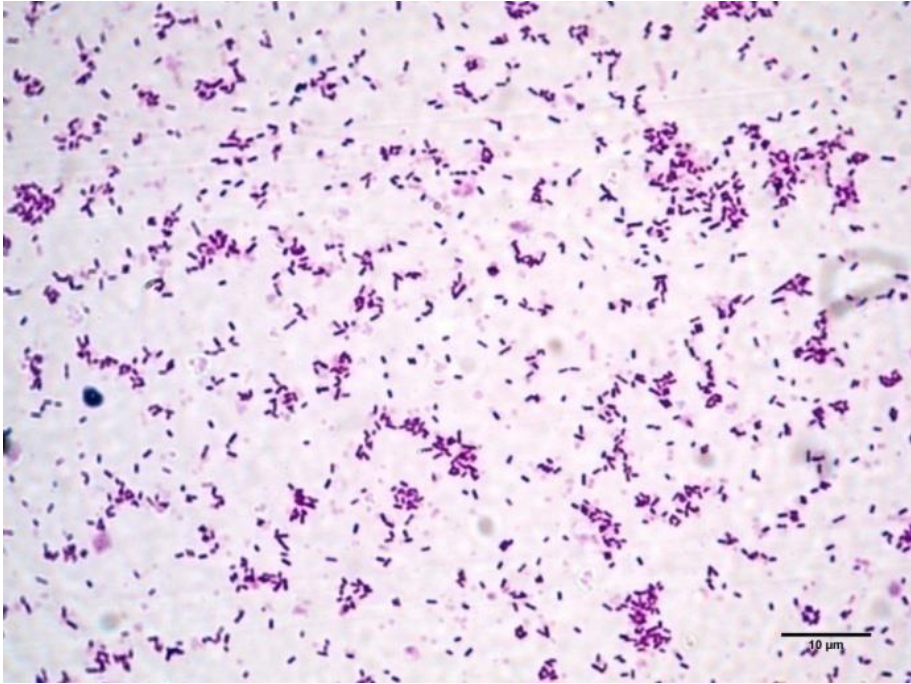
### 2.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

*Listeria*'lar Gram pozitif, kısa çubukçuk ya da kokobasiller şeklinde olup uçları yuvarlak görünümlüdür (Şekil 2.2). Tek tek, ikili, kısa zincirler halinde, bazen de "V" şeklinde görülürler. Bu bakteriler 0,4-0,5 µm çapında, 0,5-2,0 µm uzunluğunda, sporsuz ve kapsülsüzdürler. *Listeria*'lar 6-20 µm uzunluğunda filamentlere sahiptirler. 20-25 °C ve 24 saatlik kültürlerde aktif olarak hareket ederlerken, 37 °C 'de hareketleri daha zayıftır. Aerob ve fakültatif anaerob özelliklere sahiptirler (Farber, 1991).

*Listeria*'ların gelişmesi için en uygun sıcaklık dereceleri 30-37 °C'dir. Fakat gelişme sıcaklıkları 1-45 °C arasında değişmektedir. *Listeria* cinsi içinde patojen ve en önemli olan tür *L. monocytogenes*'tir. *Listeria*'lar glukoz fermentasyonu sonucunda laktik asit üretirler. H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Voges-proskauer, metil kırmızısı ve katalaz reaksiyonları pozitif; oksidaz, indol ve üre reaksiyonları negatiftir. Esculin ve sodyum hippuratı hidrolize ederler. Fakat kazein, jelâtin ve sütü hidrolize edemezler (Ekici vd., 2004). Üremeleri için en uygun pH 7,2-7,6'dır. Ancak pH'nın 4,1'e düştüğü durumlarda da gelişebilmesi ve canlılığını sürdürebilmesi, virulansı açısından önemli rol oynamaktadır.

Çünkü bu bakterinin insan midesinden geçerken olumsuz koşullara dayanabildiği belirlenmiştir (Cotter vd., 2000; McLauchlin vd., 2004).

*L. monocytogenes*'in kanlı agarda 48 saat sonra oluşturduğu küçük, gri, damla benzeri koloniler beta-hemoliz zonu ile çevrili olarak görülür (Kelen ve Lindsay, 1990). Nutrient agarda koloniler dışbükey, saydam, dikey ışıkta mavimsi gri, eğik ışıkta ise karakteristik parlak mavi-yeşil görünürler. Yapışkan özelliğe sahip olduğundan, besiyerlerinden izolasyonları ve tanımlamaları zordur. Genellikle çoğu besiyerinde rahatlıkla üreyebilmesine karşın gelişmesi için bazı B grubu vitaminlere (örn. biotin, riboflavin, tiamin, tiotik asit) ve aminoasitlere (örn. sistein, glutamin, lösin, valin) ihtiyaç duymaktadır (Telli, 2012).



Şekil 2.2. *Listeria monocytogenes*'in Mikroskopik Görüntüsü (Anonim c, 2016)

### 2.2.5. Enfeksiyon aracı olan gıdalar

Listeriosisin ilk salgınları epidemiyolojik olarak çiğ sebzelerin tüketimiyle ilişkili olmuştur. CDC, son on yıldır meyve ve sebzelerden kaynaklanan gıda kaynaklı hastalık salgınlarında artış olduğunu rapor etmiştir. Genellikle tüketime hazır olan ve buzdolabı ısılarında uzun süre depolanan gıdalar en riskli olanlardır (Solmaz vd., 2007).

Son yıllarda tavukçuluk sektöründeki hızlı gelişmelere ve tüketim artışına paralel olarak, gıda zehirlenmeleri artmıştır. Tavuk eti ekonomik ve besleyici olmasına rağmen, üretim ve özellikle kesim işlemleri sırasında hijyen kurallarına uyulmaması, çapraz bulaşmalar, yetersiz pişirme ve muhafaza hataları nedeniyle *Listeria monocytogenes* ve çoğu patojen mikroorganizmanın önemli bir kaynağı olmuştur (Çolak vd., 2008).

Gıdalar *Listeria* türleri ile hem direk bulaşmakta hem de gıdaların üretim, paketlenme, depolama, satışı ve tüketimi sırasında çalışanlar veya enfekte materyal ile sekonder olarak da bulaşmaktadır. Yapılan çalışmalar, *Listeria* enfeksiyonlarının, çoğunlukla gıdaların işlenmesi aşaması ile çiftçi ve hayvanlardan kaynaklı olduğunu belirtmektedir (Ekici vd., 2004).

Et ve et ürünlerinin *Listeria* türleri ile bulaşmasında çeşitli kaynaklar rol oynamaktadır. Bulaşmasına mezbaha ve et işletmelerinin çok önemli bir yeri vardır. Buralarda hayvanların dışkıları, derileri ve ayaklarından, ayrıca işletmede çalışan personelin elleri, elbiseleri ile kullandıkları aletlerden, işletmede kullanılan sulardan ve çevreden bulaşma olmaktadır. Etin işlenmesi ve et ürünlerinin üretimi sırasında insanlar ile et kesme ve işleme ekipmanları da *Listeria*'ların bulaşma kaynağı olabilir (Sancak vd., 2007).

#### **2.2.6. Patojenite ve tedavi**

*L. monocytogenes*, intestinal sistem dışında birçok doku, organ ve sistemde çeşitli hastalıklara neden olabilen bir patojen olması nedeniyle çok önemli bir türdür. Birçok hayvan türünde listeriozis olgusu görülmektedir. Bu olgularda hayvanların dışkılarında gözlenen *L. monocytogenes* çevrenin bulaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. *L. monocytogenes*, hasta hayvanların yanı sıra sağlıklı hayvanların dışkılarından da izole edilebilmektedir. Özellikle silajla beslenen ruminantlarda diğer hayvan türlerinden daha fazla listeriozis olgusu görülür. Hasta hayvanlar salgılarıyla çevrede bulaşmaya neden olabilmektedir. Sağlıklı hayvanlara bulaşma daha çok oral yolla gerçekleşmektedir (Koçan ve Halkman, 2006).

*L. monocytogenes* insanlarda menenjit, septisemi, konjuktivit, deri ve mukoza lokalizasyonları ve kan tablosunda monositoza neden olmaktadır. Bulaşmış gıda tüketimi ile az miktarda *L. monocytogenes* alımı, sağlıklı yetişkinlerde herhangi bir klinik belirtiyeye yol açmazken, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerin bu canlıya daha hassas olduğu bilinmektedir (Goulet vd., 2006). Fakat etkili olduğu hastalıkların nadiren sağlıklı yetişkinlerde de görüldüğü bilinmektedir. Bunun nedeni bulaşmış gıda tüketimi ile çok sayıda bakterinin alınmasıdır. Özellikle hamilelerde listeriozis enfeksiyonları, grip benzeri semptomlar göstermekte ve plasenta yolu ile fetusa geçebildiği için erken sancı, düşük, ölü doğum, yeni doğan bebeğin erken ölümüne veya konjenital anomali doğumlara neden olabildiği saptanmıştır. Ölüm oranı oldukça yüksektir, bebeklerde %50 ve diğer gruplarda en az %25'dir (Rhoades vd., 2009).

Gıda tüketildikten 12 saat sonra ateş, karın krampları, diyare, yorgunluk, baş ağrısı ve kusma ile seyreden gastrointestinal bir sendrom meydana gelmekte ve listeriyal menenjit ve bakteriyemi gibi daha ciddi durumlar ancak günler veya haftalar sonra ortaya çıkmaktadır. Bu sendromların başlama süresi 11-70 gün arasında (ortalama 21 gün) değişmekte olup, bu sürenin enfektif doza ve hastanın durumuna bağlı olduğu bildirilmektedir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

*L. monocytogenes*'in neden olduğu listeriozisin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır ancak *L. monocytogenes* Listeriolizin adı verilen bir hemolisin üretimine göre patojenite göstermektedir. Listeriolizin, hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar açarak hücrenin geçirgenliğini bozan ve parçalanmasına neden olan toksik bir maddedir (Arda vd., 1999).

*L. monocytogenes*'in insanlardaki enfeksiyon dozu tam olarak bilinmemektedir (Norrung, 2000; McLauchin vd., 2004). Enfeksiyonun giriş noktası sindirim sistemi olup, inkübasyon periyodu sindirimi takiben bir gün içinde meydana gelmektedir. *L. monocytogenes* organizmaya girdikten sonra ilk gün karaciğer ve dalakta kalır. Bu süre içerisinde makrofajlara girerek 48 saat içerisinde logaritmik olarak çoğalarak makrofajları parçalar. Daha sonra granülomatoz lezyonların oluşmasına neden olur ve septisemi ile enfeksiyon organizmanın diğer kısımlarına da yayılır (Kolb-Maurar vd., 2000).

*Listeria* genellikle antimikrobiyal tedaviye duyarlıdır ve direnç nadirdir. Ampisilin veya penisilinG en çok tercih edilen ilaçlardır. Ancak merkezi sinir sistemi enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlarda tek başına tedavide yetersiz kalabilmektedirler. Bu nedenle genellikle ciddi enfeksiyonlarda bakterisidal bir ajan olan gentamisin ile birlikte tedavi yapmak etkinliği arttırmaktadır. Optimal tedavi süresi bilinmemektedir ve muhtemelen hastaya ve enfeksiyonun tipine göre değişkendir (Lorber, 1997).

### 2.3. Biyofilm Tanımı ve Yapısı

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir EPS matriks içine gömülü mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Costerton vd., 1999). Bu matriks içindeki hücreler kendilerine özgü bir fenotip oluşturacak şekilde bazı fizyolojik, metabolik ya da fenotipik değişimlere uğrarlar. Yapılan son çalışmalar biyofilmlerin hem içinde mikroorganizma barındıran homojen tabakalardan ibaret olduğunu, hem de aralarında koordinasyon sağlayan çok fonksiyonel topluluklar olduklarını da göstermektedir. Biyofilm oluşum sürecinde, yüzeye tutunan bakterilerdeki EPS sentezi ile ilgili enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin ve değişen mikro çevreye uyumda etkin olan proteinlerin yapımı artar. Bunun sonucu olarak biyofilm yapısındaki bakterilerin fenotipleri, planktonik bakterilerden farklı ve antimikrobiyallere çok daha dirençli bir hale dönüşür. Biyofilm yapısında %97 su, % 2-5 mikroorganizma, % 1-2 polisakkarit, % 1-2 protein, % 1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır. Biyofilmler tek bir tür tarafından oluşturulabildiği gibi birden çok tür tarafından da meydana getirilebilir (Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm değişik yüzeyler üzerinde oluşabilir. Gıda işletmelerinde başta tezgâhlar olmak üzere, kullanılan ekipmanlar, araç gereçler ve gıda işleme yüzeyleri üzerinde oluşabilir. Bakteriyel hücrelerin biyofilmlerden gıda maddelerine kolayca geçebilmelerinden dolayı patojen mikroorganizmaların oluşturabileceği biyofilm, gıda endüstrisi için çok önemlidir. Ayrıca gıda işletmelerinde uygulanan rutin sanitasyon işlemlerinin biyofilmi yok etmede yeterli olmadığı belirtilmektedir.

Biyofilm oluşumunun bakteriye kazandırmış olduğu bazı avantajlar vardır. Bunlar arasında,

- a. Çevrenin zararlı etkilerinden koruyan bir barınak ve homeostasi oluşturma.
- b. Sınırlı bir alanda bulunan gıdaları kullanabilme ve rekabet edebilme.
- c. Mikrobiyal türler arasında gerçekleşen metabolik etkileşimlerden yarar sağlayabilme.
- d. Yeni fenotipik özelliklerin kazanılmasına olanak veren gen transferleri yapabilme, sayılabilir (Garrett vd., 2008).

Biyofilmlerin gıda işletmelerinde sanitasyon işlemlerine direnç göstermeleri en karakteristik özelliklerindedir. Ekzopolimerik matriks tabakasının meydana getirdiği fiziksel bariyerden dolayı dezenfektanların biyofilm içerisine difüzyonu engellenmektedir. Plazmidler üzerine kodlanan direnç genleri biyofilm hücrelerinde yatay geçiş yapabilir hem de bu hücreleri antimikrobiyallere karşı dirençli hale getirebilir. (Sylla vd., 2013).

### 2.3.1. Biyofilm oluşum basamakları

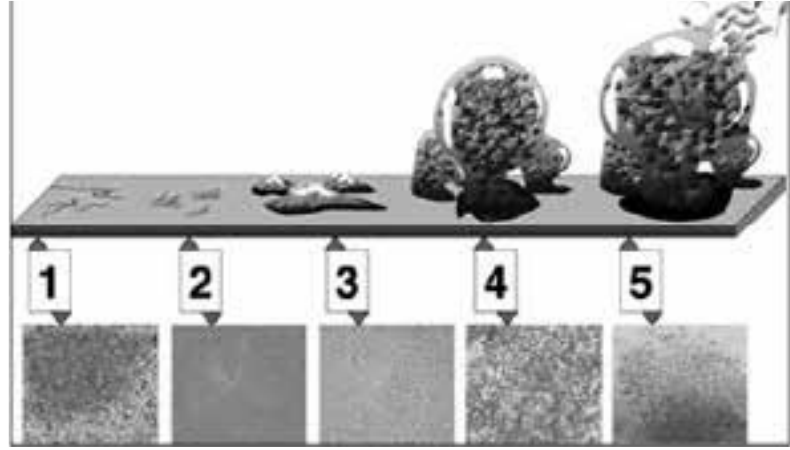
**1.Mikroorganizmanın yüzeye tutunması:** Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.

**2.Geri dönüşümsüz tutunma:** Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. EPS aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.

**3.Kolonizasyon:** Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.

**4.Olgun biyofilm oluşumu:** Bu aşamada biyofilm hücreleri gıda maddelerinin etkisiyle apartman ya da mantar şeklinde yapılara dönüşürler (Şekil 2.3).

**5.Kopma:** Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (Altun ve Şener, 2008; Akan ve Kınık, 2014).



Şekil 2.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları (Srey vd., 2013)

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi, birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerden oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. Su kanalları içinde devam eden su akışı gıda maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar (Altun ve Şener, 2008). Biyofilm yapısında bulunan maddeler ekstrasellüler matriks yapı ile birbirlerine tutunmaktadırlar. EPS yapısı mikroorganizmaların yüzeye tutunmalarına ve kolonileşmelerine yardımcı olmaktadır. Ayrıca organizmayı ozmotik strese, toksik bileşiklere ve antibiyotiklere karşı da koruyabilmektedirler (Akan ve Kınık, 2014). Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeye bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvar yapısı, bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki gıda maddelerinin içeriği ve miktarı ya da iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (Arnold ve Silver, 2000; Lindsay vd., 2002).

### 2.3.2. Çoğunluk Algılama (quorum sensing)

Bakteriler biyofilm oluşumunu hücreden hücreye gönderilen iletişim sinyalleri ile kontrol etmektedirler. Bu sinyal sistemi "ÇA" olarak adlandırılır. Çoğunluk (quorum) ve hissetme, algılama (sensing) kelimelerinin birleşmesi sonucu oluşturulmuştur. Bu konuda ilk çalışmalar 1960'li yıllara kadar dayanmaktadır. Bu alanda ilk çalışmalar deniz suyunda yaşayan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* bakterileri üzerinde yapılmıştır (Bassler, 1999). Deniz suyunun mL'sinde 100'den daha az sayıda bulunan bu iki bakterinin normal şartlarda ışığa yapmadığı, ancak bazı deniz balıklarının ışık organellerinde  $10^{10}$ - $10^{11}$

seviyesine ulaştıklarında ışımaya neden olduklarının belirlenmesiyle çoğunluk algılama mekanizması anlaşılmıştır. Buradaki sinyal molekülünün S-adenozil metiyonin türevi bir AHL / HSL olduğu açıklanmış ve bu sinyal molekülünün sentezinden sorumlu genler tanımlanmıştır. Bu sistem, daha sonra çoğunluk algılama çalışmaları için model olarak kullanılmış ve çalışmalar bu doğrultuda ilerlemiştir.

Yapılan çalışmalar farklı mikroorganizmaların farklı mekanizmaları ve moleküllerini kullandıklarını, bazı durumlarda bir kaç çeşit sinyal molekülünün aynı anda kullandığını ortaya koymuştur. Farklı türde olmalarına rağmen aynı sinyal molekülünü kullanan mikroorganizmaların varlığı da ispatlanmıştır. Mikroorganizmaların iletişim kurmak için ürettiği sinyal moleküllerine genel olarak “otoindükleyici” adı verilmektedir (Yılmaz vd., 2015). Bu moleküller besi ortamına salınır, diğer hücreler tarafından algılanır ve bu moleküllere yanıt verilir. ÇA mekanizması türe özgü farklılıklar göstermektedir.

Bu mekanizmayı kullanan mikroorganizmalarda, örneğin bakterilerde, ortamda yeterince gıda maddesi bulunmazsa, hücre sayısı belirli bir eşik değere ulaşmadığından, bu mekanizma aktif hale geçmez ve türe özgü davranışlar sergilenmez. ÇA'nın ilk aşamasında, her türün kendine özgü genleri kullanarak, eksponansiyel fazın sonlarına doğru artan miktarda sinyal molekülü ürettiği görülmektedir. Sinyal moleküllerinin ortama salınmasının ise hücre zarı yapısındaki özel bir sistem aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. İkinci aşamada, sinyal moleküllerinin değişime uğratılması ve besi ortamına salınması protein yapısındaki özel moleküller aracılığı ile olmaktadır. Üçüncü ve son aşamada, sinyal moleküllerinin algılanması iki şekilde gerçekleşmektedir. Birinci aşama, sinyal molekülünün hücre içine alınması, ikincisi ise molekülün hücre içine alınmadan, hücre zarındaki alıcı bölgeler ile algılanmasıdır.

Bu mekanizma içinde kullanılan sinyal molekülleri genel olarak üç grupta toplanmaktadır. Bunlar; AHL veya HSL türevleri, oligopeptitler ve furanosil borat diester türevleridir (Yılmaz vd., 2015). AHL molekülleri Gram negatif bakteriler, oligopeptit grubu sinyal molekülleri ise Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Furan türevleri ise bazı Gram negatif veya Gram pozitif bakterilerde ikincil sinyal molekülü olarak görev alır. Bu mekanizma içerisinde yer alan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma şekline göre üç çeşit ÇA mekanizması vardır. Bunlar:



1. LuxI/LuxR sistemi (Gram negatif bakterilerde)
2. Oligopeptit sistemi (Gram pozitif bakterilerde)
3. Hibrit sistem (Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde) mekanizmasının kullanıldığı belirtilmiştir (Avcı, 2009).

ÇA moleküllerini hücrel metabolitlerden ayıran temel özellikler; ÇA molekülünün özel bazı koşullar altında salınması, hücre dışında birikmesi ve özgün reseptörlerce tanınması, molekül miktarı belli bir eşiği aştığında planlanmış bir yanıtın ortaya çıkması ve bu yanıtın ÇA molekülünün metabolize ya da detoksifiye edilmesinden çok daha geniş olmasıdır.

Gıda endüstrisi ve insan sağlığı için önemli olan biyofilm gelişiminin ÇA mekanizması ile kontrol edildiği belirtilmektedir. Biyofilm gelişim süreciyle ilgili yapılan genetik çalışmalarda, hem hücre dışı sinyallerin hem de ÇA mekanizmasının biyofilm gelişim sürecinde etkili olduğu belirtilmiştir (Gülgör ve Korukluoğlu, 2014).

### **2.3.3. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi**

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde birinci aşama biyofilm gelişmeden gerekli önlemlerin alınmasıdır. İşletmelerde, düzenli aralıklarda uygun ve yeterli bir temizlik yapılarak mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler temizlenmelidir. Daha sonra etkili bir dezenfeksiyon uygulaması yapılmalıdır. Mekanik kuvvet uygulamak biyofilmin yüzeylerden uzaklaşmasında çok önemlidir. Son yıllarda biyofilm oluşumunun engellenmesi için yüksek basınçlı temizleme sistemleri, enzimler, katalize modifiye yüzeyler, ultrason, elektriksel alanlar, deterjan maddeleri, amonyak ve formaldehit kullanımı tercih edilmektedir. Fakat bu işlemlerin etkinliği uygulanan yüzeye, mikroorganizma türlerine ve uygulama biçimine göre değişiklikler gösterebilmektedir. (Gün ve Ekici, 2009).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmamızda Eskişehir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde *Salmonella* spp. tespiti için 490 numune ve *L. monocytogenes* tespiti için de 113 numune analiz edilmiştir.

##### 3.1.1. Kullanılan bakteriler

Çalışmamızda Eskişehir ilindeki çeşitli gıda işletmelerinden alınarak analiz için Eskişehir Gıda Kontrol Laboratuvarına getirilen numunlerden izolasyonu ve tanımlamaları yapılan *Salmonella* ve *L. monocytogenes* suşları kullanılmıştır.

##### 3.1.2. *Salmonella* türlerinin izolasyon ve tanımlamalarında kullanılan gereçler ve hazırlanışları

SX2(Biomerieux SX2 Broth 42121), XLD (Merck 1.05287), Nutrient Broth (Merck 1.05443),XLT-4 Agar (Biomerieux AEB523420 42121), TSI Agar (Merck 1.03915), MR-VP Broth (Merck 1.05712.), Sitrat Besiyeri (Merck 1.02501), Üre Broth (Merck 1.08483), Lisin Dekarboksilaz Broth (OXOID CM0308), Tryptone Broth (Merck 1.10859), Metil Kırmızısı Çözeltisi (Merck 1.06076), Kovacs Ayıracı (Merck 1.09293), Alfa Naftol Solüsyonu (Merck Art 822289), %40'lık Potasyum Hidroksit Solüsyonu (Merck 1.05012), ONPG Diskleri (OXOID DD13 ONPG).

##### 3.1.2.1. *Salmonella xpress2*

10 mL'lik tüplerde hazır olarak temin edilmiştir. +4°C de saklanmıştır.

##### 3.1.2.2. Xylose lysine deoxycholate agar

50 mL distile su içinde 55,0 g/L besiyeri olacak şekilde tartılmış 950 mL distile su ilave edilmiştir. Besiyeri iyice karıştırılmıştır. Otoklavlanmadığı için kaynar su

banyosunda agar eriyinceye kadar tutulmuştur. Hızlıca 45- 50 °C 'ye soğutulup 12,5 mL'lik steril petri kutularına dökülmüştür. Besiyeri kırmızı renklidir. 25 °C' de pH'sı 7,4±0,2'dir.

### **3.1.2.3. Nutrient broth**

Dehidre besiyeri 8 g/L tartılmış distile su ilave edilerek eritilmiş ve 10 'ar mL tüplere dağıtılmıştır, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri sarı-kahve renklidir, 25 °C'de pH'sı 7,0 ±0,2'dir.

### **3.1.2.4. Xylose lysine tergitol4**

Petrilere dökülmüş olarak hazır formu kullanılmış ve +4 °C de saklanmıştır.

### **3.1.2.5. Triple sugar iron**

Dehidre besiyeri 65,0 g/L tartılmış, distile su ilave edilmiş ve mikrodalga fırın da eritilmiştir. Sıvı halde olan besiyeri 7'şer mL 16 X 160 mm tüplere dağıtılmıştır. 121 °C 'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra sıvı halde iken yatık bir şekilde yaklaşık olarak 2,5 cm bir kalınlık oluşturulmuş ve besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Besiyeri kırmızı renkli olup 25 °C 'de pH'sı 7,4±0,2'dir.

### **3.1.2.6. Metil kırmızısı voges proskauer**

Dehidre besiyeri 17 g/L tartılmış distile su ilave edilerek eritilmiş, 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. 45-50 °C'a soğutulup tüplere 5'er mL dökülmüştür. 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir.

### **3.1.2.7. Sitrat besiyeri**

Dehidre besiyeri 22,3 g/L tartılmış, distile su ilave edilmiş ve mikrodalga fırın da eritilmiştir. Sıvı halde olan besiyeri 7'şer mL 16 X 160 mm tüplere dağıtılmıştır. 121 °C 'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra sıvı halde iken yatık bir

şekilde yaklaşık olarak 2,5 cm bir kalınlık oluşturulmuş ve besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Besiyeri yeşil renkli olup 25 °C 'de pH'sı  $6,6\pm 0,2$ 'dir.

### **3.1.2.8. Üre broth**

Dehidre besiyeri, 38,5 g/L olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak distile su içinde eritilmiş. Tüplere 3'er mL dağıtılmış en fazla 60 °C'a kadar ısıtılarak sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak, portakal renkli ve 25 °C'da pH'sı  $6,8\pm 0,2$ 'dir.

### **3.1.2.9. Lisin dekarboksilaz broth**

Bu besiyeri tablet şeklinde olup her bir tablet bir tüpe atılmış ve üzerine 5 mL distile su eklenip çözündürülerek hazırlanmıştır. Otoklavda  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$  de 15 dakika otoklavlanmıştır.  $+4^{\circ}\text{C}$  de saklanmıştır.

### **3.1.2.10. Tryptone broth**

Dehidre besiyeri 15,0 g/L tartılmış distile su ilave edilerek çözülmüş ve 10 'ar mL tüplere dağıtılmıştır,  $121^{\circ}\text{C}$  'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri sarı renklidir,  $25^{\circ}\text{C}$  'de pH'sı  $7,3\pm 0,2$ 'dir.

### **3.1.2.11. Metil kırmızısı çözeltisi**

0,1 g Metil kırmızısı, 300 ml % 96 lık etil alkolde çözülmüş. Üzerine 200 mL distile su ilave edilmiştir.

### **3.1.2.12. Ortho nitrophenyl b-d-galacto-pyranoside**

Hazır olarak temin edilmiştir.  $+4^{\circ}\text{C}$  de saklanmıştır.

### **3.1.2.13. Kovacs ayıracı**

Hazır olarak temin edilmiştir.

#### **3.1.2.14. Alfa naftol solüsyonu**

5 g alfa naftol tartılır.100 mL etil alkol ile karıştırılmıştır. Bu çözelti saman sarısı renkte olmalıdır.

#### **3.1.2.15. %40'lık potasyum hidroksit solüsyonu**

40 g potasyum hidroksit tartılmış, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### ***Listeria monocytogenes* türlerinin izolasyon ve tanımlamalarında kullanılan gereçler ve hazırlanışları**

Half-Fraser Broth (Biomerieux Half-Fraser Minibag 42727), Fraser Broth (Biomerieux 42072), ALOA (Biomerieux AEB520080), TSB (Merck, 1.05459).

#### **3.1.3.1. Half-fraser broth**

Hazır temin edilmiştir. +4°C de saklanmıştır.

#### **3.1.3.2. Fraser broth**

Hazır temin edilmiştir. +4°C de saklanmıştır.

#### **3.1.3.3. Agar listeria according to ottaviani & agosti**

Hazır olarak petrilere dökülmüş halde elde edilmiştir. +4°C de saklanmıştır.

#### **3.1.3.4. Tryptic soy broth**

Dehidre besiyeri 30,0 g/L tartılmış distile su ilave edilerek çözülmüş ve 10 'ar mL tüplere dağıtılmıştır, 121 °C 'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri sarı renklidir, 25 °C 'de pH'sı 7,3±0,2'dir.

### 3.1.4. Kullanılan referans suşlar

Çalışmamızda *L. monocytogenes* ATCC 19115 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 referans suşları kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5. Kullanılan cihazlar

- Otoklav
- İnkübatör
- Analitik terazi
- Stomacher
- pH metre
- Mini Vidas (Biomerieux Mini VIDAS / IVDI206954)
- VITEK2 Compact (Biomerieux Vitek 2 Compact / BA8524BMX)
- Altın Kaplama Cihazı (Polaron SC7620 Sputter Coater)
- SEM (JEOL JSM-5600LV)

### 3.1.6. Taramalı elektron mikroskopik inceleme için kullanılan fiksatif ve materyallerin hazırlanışları

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Disodyum Fosfat) (Sigma, Aldrich-ABD),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potasyum dihidrojen fosfat) (Merck 1.04873.1000), Glutaraldehit (EMS, ABD),  $\text{OsO}_4$  (Osmium Tetroksit) (EMS, ABD), Etanol (Sigma, Aldrich-ABD).

#### 3.1.6.1. Fosfat tampon solüsyonu

a. Sodyum Tamponu

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 7,42 \text{ g}$

Distile su  $\rightarrow 412,5 \text{ mL}$

b. Potasyum tamponu

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \rightarrow 5,675 \text{ g}$

Distile su  $\rightarrow 412,5 \text{ mL}$

Hazırlanan tamponlardan sırasıyla 360 mL Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>'den ve 55 mL KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>'den alınıp karıştırılmış ve tampon solüsyonumuz hazırlanmıştır. pH 7,4 olmalıdır.

### **3.1.6.2. %2,5'lük glutaraldehit tespit solüsyonu (primer fiksatif)**

Hazırlanan PBS tamponundan 20 mL, Glutaraldehitten 3 mL alınarak koyu renkli bir şişeye konmuştur. Hazırlanan glutaraldehitli tamponun tekrar pH sı ölçülür. 7,2 olmalıdır.

### **3.1.6.3. %'1 lik osmiyum tetraoksit tespit solüsyonu (sekonder fiksatif)**

0.1 g OsO<sub>4</sub>

5 mL Distile su

5 mL PBS tampon

Koyu renkli bir şişeye alınarak yıkanmış ve distile sudan geçirilmiştir. Pudrasız bir eldiven yardımıyla osmiyum ampülü deterjanla yıkanarak distile sudan geçirilmiştir.

5 mL distile su koyu renkli bir şişeye alınmıştır. Osmiyum ampülü hızla ve dikkatlice kırılarak tüpüyle birlikte şişenin içine atılmıştır. Hemen ağzı kapatılıp ve parafilmlelenmiştir. +4°C' de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün bir mililitre osmiyum ve bir mililitre tampon karıştırılarak hazırlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

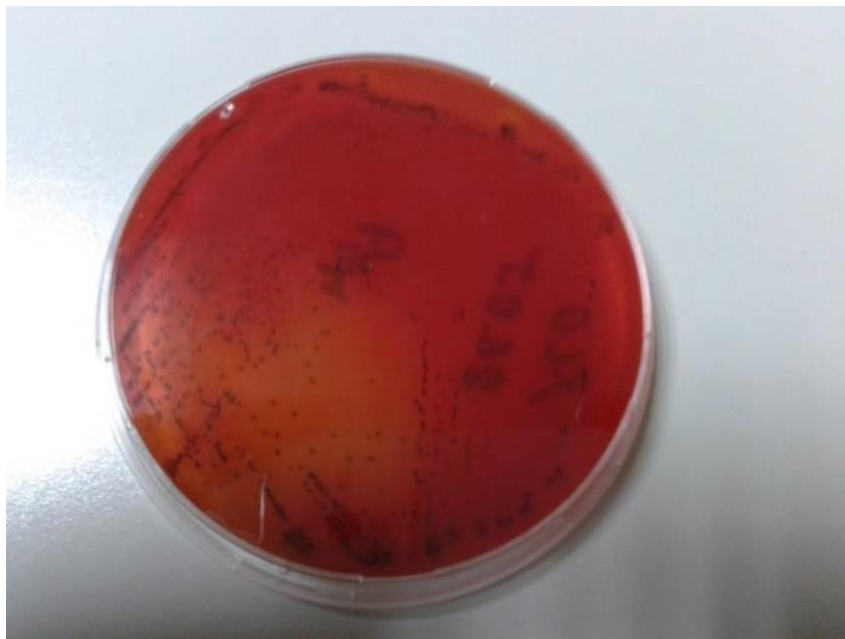
### **3.2.1. *Salmonella* spp. izolasyonu ve tanımlaması**

Alınan 25g (mL) numune, 225 mL tamponlanmış peptonlu su ile aseptik koşullarda homojenize edilmiş ve 35+1°C'de 16-22 saat inkübe edilerek zenginleştirme yapılmıştır. İnkübasyondan sonra süspansiyondan 0,1 mL alınarak 10 mL'lik SX2 (*Salmonella* Xpress 2) sıvı besiyerine aktarılıp, 22-26 saat 42+1°C'de inkübe edilecek ve inkübasyondan sonra SX2 sıvı besiyerinde homojenize edilmiştir.

Homojenize olan SX2 sıvı besiyerinden 0,5 mL alınarak VIDAS stripindeki numune kuyucuğuna aktarılmıştır. Strip, VIDAS Heat and Go tarafından 15+1 dakika ısıtılıp, ısıtma işlemi bitince strip çıkartılıp ve 10 dakika soğuması için beklenmiştir. Strip daha sonra VIDAS cihazına konulmuştur. (VIDAS *Salmonella*, otomatik VIDAS sisteminde, ELFA yöntemi (Enzim Bağlantılı Floresan Test) kullanılarak, *Salmonella* antijenlerinin saptanması için kullanılan bir enzim immün testtir).

VIDAS çıktısına göre sonuç,  $< 0,23$  Negatif veya  $\geq 0,23$  Pozitif olarak okunduktan sonra, pozitif olması durumunda SX2 sıvı besiyerinden öze ile alınarak XLD, XLT-4 Agara geçilmiş ve  $37+1^{\circ}\text{C}$  de 24+3 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda; XLD agar besiyerinde kolonilerin merkezleri siyah pembe koloniler oluşturmaları, XLT-4 besiyerinde ise koloniler  $\text{H}_2\text{S}$  oluşumuna bağlı olarak siyah renkli olarak gözükmeleleri karakteristiktir (Şekil 3.1). Tanımlama için 2 besiyeri kullanılır. 1. besiyeri olarak XLD agar, 2. besiyeri olarak XLT-4 Agar ve benzeri kullanılmıştır. Besiyerinde üremiş olan tipik kolonilerden 5'er tanesi işaretlenmiştir. Bunlardan bir tanesi Nutrient broth besiyerine saflaştırmak üzere ekilmiş ve  $37+1^{\circ}\text{C}$  de 24+3 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.1.XLT-4 Agar Besiyerinde *Salmonella* spp. İzolatlarının Koloni Morfolojisi



### 3.2.2. *Salmonella* spp. doğrulama testleri

Nutrient broth'ta inkübasyon sonunda gelişen tipik kolonilere biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bu testler; glikozdan asit ve gaz oluşumu, laktozdan asit oluşumu, sükrozdan asit oluşumu, H<sub>2</sub>S oluşturma, üre hidrolizi, lizin dekarboksilasyon reaksiyonu, VP reaksiyonu ve indol üretimidir. Sonuçlar *salmonella* spp. için uygulanan biyokimyasal testler tablosuna göre değerlendirilmiş ve referans suş olarak *S. typhimurium* ATCC 14028 kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Doğrulama işlemine daha sonra VITEK-2 Compact cihazı kullanılarak devam edilmiştir. Test edilecek organizmanın alt kültürü alınmış ve 3,0 mL steril salini (su içeriği %0,45 ile %0,50 NaCl, pH 4,5 ile 7,0) saydam polistiren test tüpüne (12mm x 75mm) aseptik olarak aktarılmıştır. Daha sonra VITEK2 Gram negatif tanımlaması için 0,50 ile 0,63'e eşdeğer McFarland'a ayarlanmıştır. Oluşturulan Süspansiyon tüpü ve Gram negatif kartı VITEK2 kasetine yerleştirilmiştir. Hazırlanan kaset VITEK cihazına verilmiş ve *Salmonella* spp. tanımlaması yapılmıştır.

Çizelge 3.1. *Salmonella* spp. İçin Uygulanan Biyokimyasal Testler (TSE, 2005)

Biyokimyasal test	<i>S.typhi</i>	<i>S.paratyphi</i> A	<i>S.paratyphi</i> B	<i>S.paratyphi</i> C	Diğer <i>Salmonella</i>
Glikozdan asit	+	+	+	+	+
Glikozdan gaz	-	+	+	+	+
Laktozdan asit	-	-	-	-	-
Sükrozdan asit	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	+	-	+	+	+
Üre hidrolizi	-	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	+	-	+	+	+
ONPG testi	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
İndol Üretimi	-	-	-	-	-

### **3.2.2.1. Glikozdan asit ve gaz reaksiyonu, laktozdan asit reaksiyonu, sükrozdan asit reaksiyonu, hidrojen sülfür reaksiyonu**

Bu testler TSI agar kullanılarak yapılmıştır. Üreyen kolonilerden TSI agar içeren tüplere, öze ile yüzeye sürme, aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılarak inoküle edilmiştir. Sonra Tüpler,  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de  $24\pm 3$  saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra TSI agar besiyerinin dip kısmında rengin kırmızıdan sarıya dönüşümü glikoz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.2. Üre hidrolizi**

Bu test için Üre Broth kullanılmıştır. Üreyen kolonilerden öze ile Üre Broth besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler,  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de  $24\pm 3$  saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, besiyeri rengi, hafif kırmızıdan gül pembesine dönerse üre pozitif olarak değerlendirilmiştir. Besiyeri renginde bir değişiklik olmazsa test sonucu negatif olarak kabul edilmiştir. *Salmonella* için üre negatiftir.

### **3.2.2.3. Lizin dekarboksilasyon reaksiyonu**

Bu test için, Lizin dekarboksilaz broth kullanılmıştır. Üreyen kolonilerden öze ile Lizin dekarboksilaz broth besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler,  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de  $24\pm 3$  saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri rengi, menekşe mor rengi alırsa pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sarı renk ise negatif olarak kabul edilmiştir.

### **3.2.2.4. Voges proskauer**

İnkübasyon sonrasında VP testi için ayrılan tüpe, 0,6 mL  $\alpha$ -naftol çözeltisinden damlatılarak karıştırılmıştır. Üzerine 0,2 mL % 40'lık potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Böylece ortamdaki diasetil, asetoine okside olmuştur. Bunun üzerine 15 dakika içinde üst kısımda pembeden parlak kırmızıya kadar değişen halka oluşumu pozitif, halka oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.5. İndol testi**

Hazırlanan İndol Nitrat broth besiyerine, saflaştırılmış karakteristik kolonilerden öze ile inoküle edilerek  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de 72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere 0,2–0,3 mL kovacs ayırıcı damlatılmıştır. Üst kısımda kırmızı halka oluşumu pozitif, sarı-kahverengi halka oluşumu negatif kabul edilmiştir.

### **3.2.2.6. $\beta$ -galaktosidaz testi**

Bu test için ONPG diskleri kullanılmıştır. Steril bir deney tüpüne disk yerleştirilmiştir. Üzerine 0,1 mL % 0,88'lik steril fizyolojik tuzlu su eklenmiştir. Öze ile tipik koloniden alınarak disk ve steril fizyolojik su içeren tüpte emülsifiye edilmiştir.  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de inkübe edilmiştir. 6 saat süreyle, saat başı kontrol edilerek, tüpte laktoz fermentasyonu olup olmadığı incelenmiştir. 6 saat sonunda bir değişiklik olmazsa süre 24 saate kadar uzatılabilir. Süre sonunda tüplerde sarı rengin meydana gelmesi ONPG pozitif, renk değişikliğinin olmaması ise ONPG negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.7. Metil kırmızısı testi**

Hazırlanan MR-VP besiyerine, saflaştırılmış karakteristik kolonilerden öze ile inoküle edilerek  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de 96 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MR-VP içeren tüpten 1 mL alınarak VP testi için ayrılmış, geri kalanı MR testi için kullanılmıştır. Bu amaçla MR test tüpüne birkaç damla metil kırmızısı çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Belirgin bir kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi olmazsa sonuç negatiftir.

### **3.2.2.8. Sitrat testi**

Hazırlanan sitrat besiyerine, saflaştırılmış karakteristik kolonilerden öze ile sürme yapılarak inoküle edilmiştir. Ekim yapılmış besiyeri  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de 96 saat inkübe edilmiştir. Orijinal rengi yeşil olan sitrat besiyerinin maviye dönüşmesi ve ekim hattı boyunca üreme gözlenmesi, pozitif olarak değerlendirilmiştir. Besiyeri rengi değişmemişse sonuç negatiftir.

### 3.2.3. *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve tanımlaması

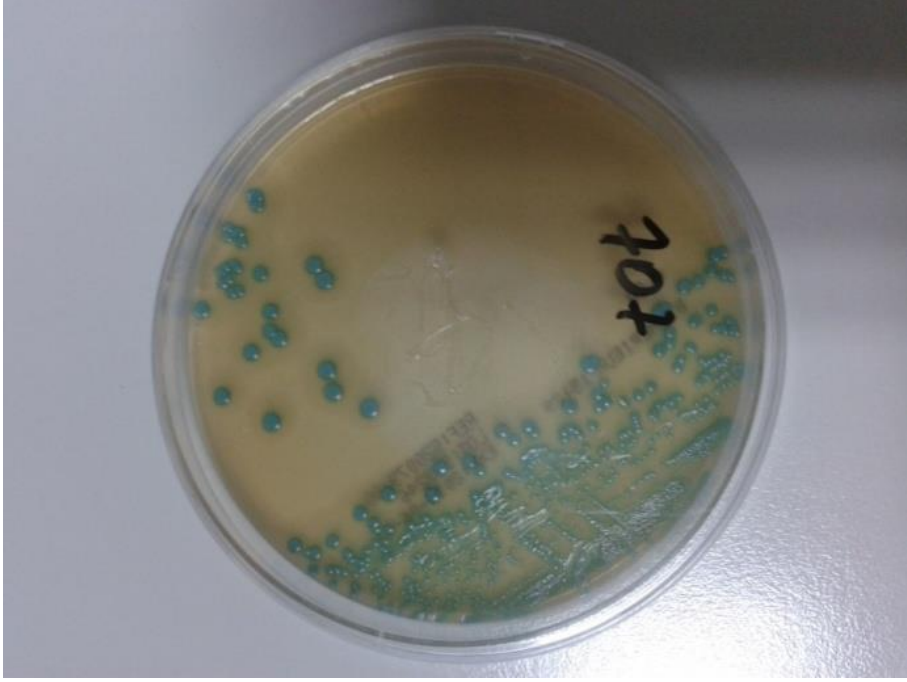
25 g (25 mL) numune, 225 mL Half-Fraser sıvı besiyerine aseptik olarak eklenmiştir. Stomacher torbası içinde homojenize edilmiştir. 24-26 saat  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  de inkübe edildikten sonra karıştırılmış ve 10 mL Fraser Broth sıvı besiyerine 40 $\mu\text{L}$  *Listeria* selective enrichment supplement süspansiyonundan (%70'lik 2 mL etanolde eritilerek hazırlanır) 0,1 mL transfer edilmiştir. 24-26 saat  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de inkübe edildikten sonra, 0,5 mL sarsmadan alınarak oda sıcaklığına getirilmiş olan VIDAS stripinde kuyucuğuna konularak VIDAS cihazına alınmıştır. Sonuçlar  $\leq 0,05$  Negatif veya  $\geq 0,05$  Pozitif olarak okunmuştur.

### 3.2.4. *Listeria monocytogenes* doğrulama testleri

*L. monocytogenes* pozitif çıkan sonuçlar doğrulama testine tabi tutulmuştur. Bunun için Fraser broth besiyerinden bir öze dolusu alınarak ALOA agar besiyerine öze ile ekim yapılmıştır.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyondan sonra petride zonlu turkuaz mavisi renkli koloniler *L. monocytogenes* olarak kabul edilmiştir. Referans suş olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115 kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Doğrulama işlemine daha sonra VITEK-2 Compact cihazı kullanılarak devam edilmiştir. Test edilecek organizmanın alt kültürü alınmış ve 3,0 mL steril salini (su içeriği %0,45 ile %0,50 NaCl, pH 4,5 ile 7,0) saydam polistiren test tüpüne (12mm x 75mm) aseptik olarak aktarılmıştır. Daha sonra VITEK2 Gram pozitif tanımlaması için 0,50 ile 0,63'e eşdeğer McFarland'a ayarlanmıştır. Oluşturulan Süspansiyon tüpü ve Gram pozitif kartı VITEK2 kasetine yerleştirilmiştir. Hazırlanan kaset VITEK cihazına verilmiş ve *L. monocytogenes* tanımlaması yapılmıştır.

İdentifikasyonu yapılan izolatlar biyofilm deneyleri başlatılana dek  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanmış olup çalışmanın başlangıcında 10 mL TSB besiyerine ekilerek,  $35-37^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilerek tazelenmişlerdir.



Şekil 3.2.ALOA Agar Besiyerinde *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Zonlu Turkuaz Mavisi Renginde Koloni Morfolojisi

### 3.2.5. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Tüm suşlar %12.5 gliserol içeren trypcase soy broth içerisinde saklanmışlardır. İnokülasyon için tüm suşlar stok kültürlerden TSB içine alınarak bir gece boyunca 35 °C'de inkübe edilmiştir. İzolatların iki kez daha alt kültürleri yapılmıştır. Biyofilm çalışmaları için de yine TSB kullanılmış olup; hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

### 3.2.6. Biyofilm oluşumunun tayini

Çalışmamızda izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri mikrotitre plak ve tüp aderans metodları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu iki teste ilave olarak seçilen suşların farklı yüzeyler üzerindeki adezyon ve biyofilm oluşumları SEM ile tespit edilmiştir.

#### 3.2.6.1. Tüp aderans metodu

Çalışmamızda biyofilm tespiti için kullanılan testlerden biri kalitatif bir metot olan ve Christensen ve arkadaşları tarafından tanımlanan Tüp Aderans metodudur. Bir öze

dolusu bakteri kültürü alınmış %1 glikoz içeren 10 mL TSB içine inoküle edilmiştir. Tüpler 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplerin içi nazikçe boşaltılmış, PBS (pH 7,3) ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Daha sonra tüpler %0,1 kristal viole ile boyanmıştır. Boyanın fazlası deiyonize su ile yıkanmıştır ve tüpler ters pozisyonda kurutulmuştur. Kontrol izolatlarının sonuçlarına göre skorlama yapılmıştır. Tüpün duvarında ya da tabanında görünür bir film tabakası olduğunda biyofilm oluşumu pozitif kabul edilmiştir. Biyofilm derecelendirilmesi biyofilm yok (0), zayıf (+), orta derecede (++) , güçlü (+++) biyofilmolarak yapılmıştır. Deneyler iki kez tekrarlanmıştır (Christensen vd., 1982).

### **3.2.6.2. Polistiren mikrotitre plakalardaki biyofilm oluşumları**

Stepanoviç ve arkadaşlarının tanımladığı teknikle uygulanmıştır (Stepanoviç vd., 2000). 96 kuyulu steril, düz tabanlı mikrolaka kuyuları 230 µl TSB besiyeri ile doldurulmuştur. Negatif kontrol kuyuları sadece brot içerecek şekilde konulmuştur. Her kuyuya 20 µl bir gece inkübe edilmiş bakteri kültürü inoküle edilmiştir. Plaklar 24 saat 35°C de inkübasyon sonrası kuyular boşaltılmış ve ortama yapışan bakterileri tespit etmek için her kuyu 250 µl methanol ile doldurulmuştur. 15 dakika sonra mikrolakalar boşaltılmış ve havada kurutulduktan sonra 250 µl kristal viyole (Merck, Germany) ile 5 dk boyanmıştır. Çeşme suyu altında boyanın fazlası alınmıştır. Yapışan hücrelere bağlanan boya her kuyu için 250 µl 33% (v/v) glacial acetic acid ile yeniden çözdürülmüş ve her kuyunun optik yoğunluğu ChroMate 4300 mikrolaka okuyucu ile 450/630 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

Bakteriyal biyofilmler tarafından üretilen optik yoğunluklar esas alınarak izolatlar biyofilm yok, zayıf, orta ve güçlü biyofilm üreticileri olarak sınıflandırılmışlardır. ODc tespit edilmiştir. Bu değer negative kontrolün ortalama OD değeri + 3 x negatif kontrolün standart sapması olarak tanımlanmıştır. Derecelendirme yapılırken,

AbsCOV < 1.125 biyofilm yok

1.125 < Abs/ COV < 2.00 zayıf

2.00 < Abs/COV < 4.00 orta derecede

4.00 < Abs/COV < 6.00 güçlü biyofilm

Testler üç tekrarlı çalışılmış ve ortamaları alınmıştır.

### **3.2.6.3. Örneklerin farklı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumlarının taramalı elektron mikroskopik yöntemlerle hazırlanması**

Çalışmada kullanılacak yüzeyler için gıda endüstrisinde en çok kullanılan mermer, paslanmaz çelik, cam, granit, tahta ve plastik yüzeylerle çalışılmaya karar verilmiştir. Bu amaçla 1cm<sup>2</sup> yüzey alanı olacak şekilde kesilen farklı yüzeyler çalışma öncesi 10 dakika %70 etanol ile temizlenmiştir. Steril distile su ile yıkayıp 2 saat 60 °C'de kurutulduktan sonra ısıya dayanıklı cam kaplar içerisine yerleştirilip, üzerleri önce alüminyum folyo, sonra da kendi kapakları ile kapatılıp, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Tüm deneyler için bakteriler 16-18 saat boyunca 37°C'de ve 120 rpm'de TSB içinde geliştirilmiştir. Hücre konsantrasyonu Optik Densite ile tayin edilmiş olup başlangıç kültürü 10<sup>8</sup> bakteri/mL'lik son konsantrasyona ulaşmak için ayrıca dilüe edilmiştir. Homojenizasyon sonrası içerisinde farklı yüzey materyallerinin parçaları yerleştirilen 24 kuyulu doku kültür plaklarına, her kuyuya 2 mL olacak şekilde süspansiyon dağıtılmıştır. Doku kültür plakları 25 °C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. Örnekler önceden belirlenmiş farklı zaman aralıklarında (2, 4, 6, 24 ve 48 saat) pleytlerden çıkarılarak 10 mL steril distile su ile üç kere yıkandıktan sonra taramalı elektron mikroskopik takibe alınmıştır.

Bu amaçla örnekler %2,5'lük glutaraldehit (0,1 M fosfat tamponu ile hazırlanmış, pH 7.4) içinde 24 saat 4°C fiksasyon edilmiştir. Daha sonra 0,1 M PBS ile iki kez yıkandıktan sonra %1'lik OsO<sub>4</sub> içinde 1 saat daha fiksasyona alınmış ve sonra distile su ile yıkamışlardır. Örnekler dehidrasyon işlemleri için 15'er dakika etil alkol serilerinden geçirilmiştir (30%, 50%, 70%, 90%, and 96%) ve son aşamada absölü alkolle 30 dk muamele edilmişler ve havada kurutulmuşlardır. Aliminyum stablar üzerine alınarak Polaron SC7620 Sputter Coater cihazında altınla kaplanan örnekler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan SEM (JEOL JSM-5600LV) de incelenmişlerdir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Cam Yüzeyler Üzerinde ve Farklı Zaman Aralıklarında *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* Biyofilmlerinin SEM ile Görüntülenmesi Amacıyla Gerçekleştirilen Elektron Mikroskopik Takip İşlemleri



#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* Türlerinin Dağılımı

Çalışmamızda Eskişehir ilindeki gıda işletmelerinden alınarak analiz için Eskişehir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'ne getirilen numunelerde *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* taraması yapılmıştır. *L. monocytogenes* tespitinde ISO 11290-1, VIDAS ve *Salmonella* spp. tespitinde de ISO 6579, VIDAS SLM standartlarına uygun metotlar kullanılmıştır. Çalışmamız 01.03.2015-01.09.2015 arasında gelen örnekleri kapsamıştır.

*Salmonella* spp. için çalışılan 490 örneğin 8'inde (%1,63) ve *L. monocytogenes* için çalışılan 113 örneğin 6'sında (%5,31) pozitif sonuçlar alınmış ve doğrulamaları yapılmıştır. İzolasyonu yapılan gıda örnekleri ve izolasyon sayıları Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Araştırma sonuçlarımız *Salmonella* spp. türlerinin ağırlıklı olarak kanatlı etlerinden izole edildiğini ortaya koymuştur. *L. monocytogenes* ise tüketime hazır sunulan ve özellikle unlu mamüllerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* Türlerinin Dağılımı ve Yüzdeleri

Bakteri	Çalışılan Örnek Sayısı	İzole Edilen Gıda Örneği	İzolasyon Sayısı	Yüzde %
<i>Salmonella</i> spp.	490	Hindi	1	<b>1,63</b>
		Peynir	1	
		Tavuk Ciğeri	5	
		Piliç Eti	1	
		Toplam İzolasyon Sayısı	<b>8</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	113	Yaş Pasta	3	<b>5,31</b>
		Piyaz Salata	1	
		Milföy Hamuru	2	
		Toplam İzolasyon Sayısı	<b>6</b>	

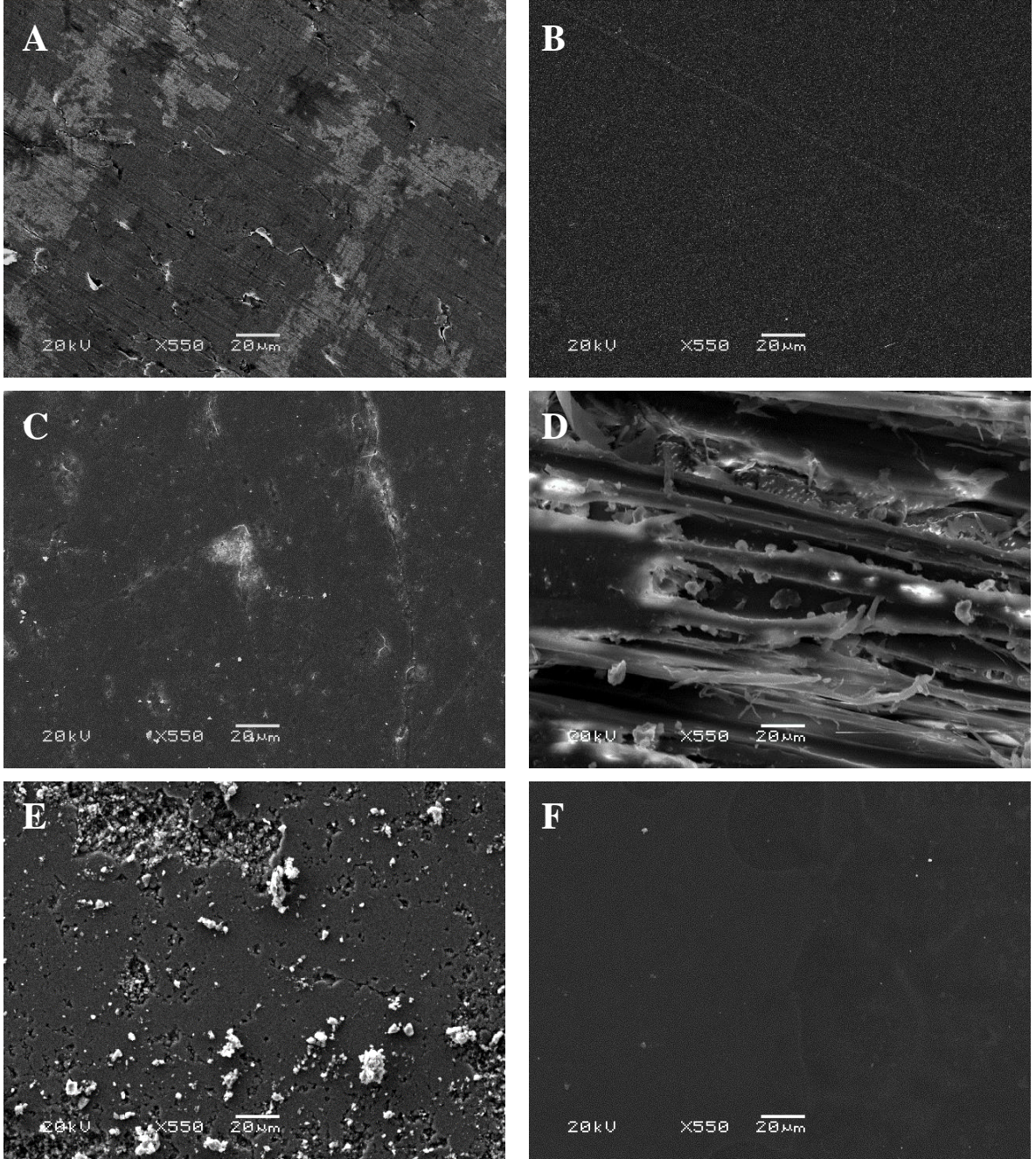
#### 4.2. İzolasyonu Yapılan Suşların Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespiti

Çalışmamızda 8 *Salmonella* spp. ve 6 *L. monocytogenes* izolatının biyofilm oluşturma yetenekleri mikrotitre plak ve tüp aderans metodu ile tayin edilmiştir. Tüp aderans metodunun sonuçları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Buna göre çalışılan tüm *Salmonella* isolatları zayıf derecede biyofilm göstermişlerdir 8 (%100). *L. monocytogenes* isolatları içinde 4’ü (%67) güçlü, 2 (%33) tanesi de orta derecede biyofilm üreticisi olarak belirlenmiştir. Tüp aderans metodu, güçlü derecede biyofilm üreten *L. monocytogenes* isolatları için mikrotitre plak metodu ile iyi bir korelasyon vermiştir ve toplam 3 izolat (% 50) güçlü ve 3 izolatta (% 50) orta derecede biyofilm üreticisi olarak belirlenmiştir. Yine mikrotitre plak yöntemi ile 1 (12,5%) *Salmonella* spp. izolatu orta ve 7 (87,5%) izolatta zayıf biyofilm üreticisi olarak tespit edilmiştir. Ancak tüp aderans metodu ile orta ve zayıf derecede biyofilm üreten isolatları ayırt etmek güç olmuştur.

Çizelge 4.2.Tüp Aderans Metodu ile İzolatların Gösterdiği Biyofilm Yüzdeleri

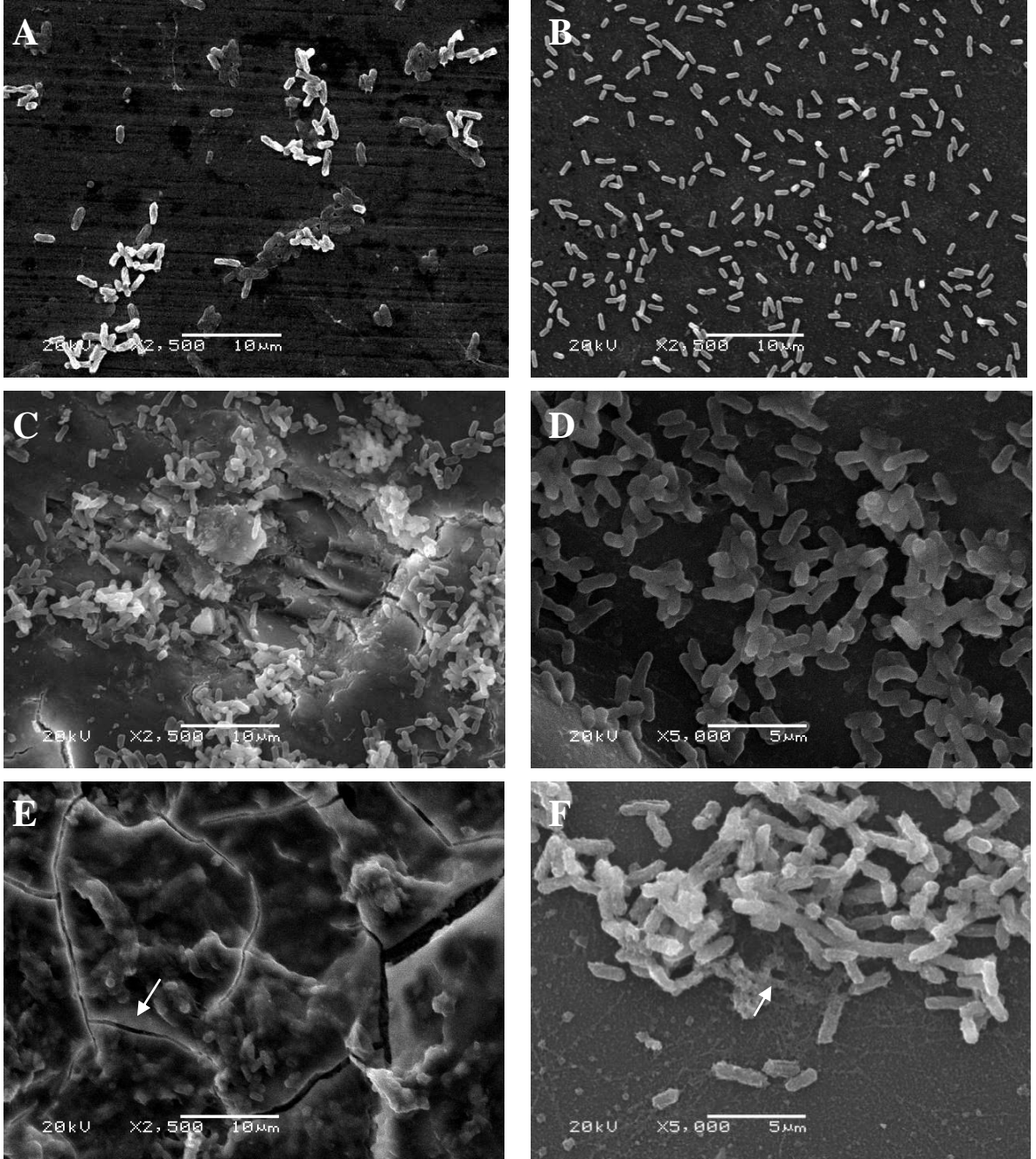
İzolat Sayısı (n)	Biyofilm Oluşumu	Tüp Aderans Metodu Sonuçları
<i>Salmonella</i> spp. (8)	Yüksek	0 (%0)
	Orta	0 (%0)
	Zayıf/Neg.	8 (%100)
<i>L. monocytogenes</i> (6)	Yüksek	4 (%67)
	Orta	2 (%33)
	Zayıf/Neg.	0 (%0)

Çalışmamızın taramalı elektron mikroskopik araştırmaları, kontrol grubuna ait yüzey örneklerinin incelenmesiyle başlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre her yüzey çeşidinde farklı derecelerde pürüzlülük tespit edilmiştir. Granit, çelik, mermer ve tahta yüzeylerde belirli derecelerde yarıklar gözlenmiştir. Plastik ve cam yüzeyler ise daha düz ve pürüzsüz olarak izlenmiştir (Şekil 4.1). Daha sonra bu yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumuna bırakılmışlardır. *Salmonella* spp. S8 ve *L. monocytogenes* 13L izolatları SEM analiz çalışmaları için seçilmişlerdir.



Şekil 4.1. Çalışılan Yüzeylerin Kontrol Mikrografları. Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) yüzeyler (Mag x550)

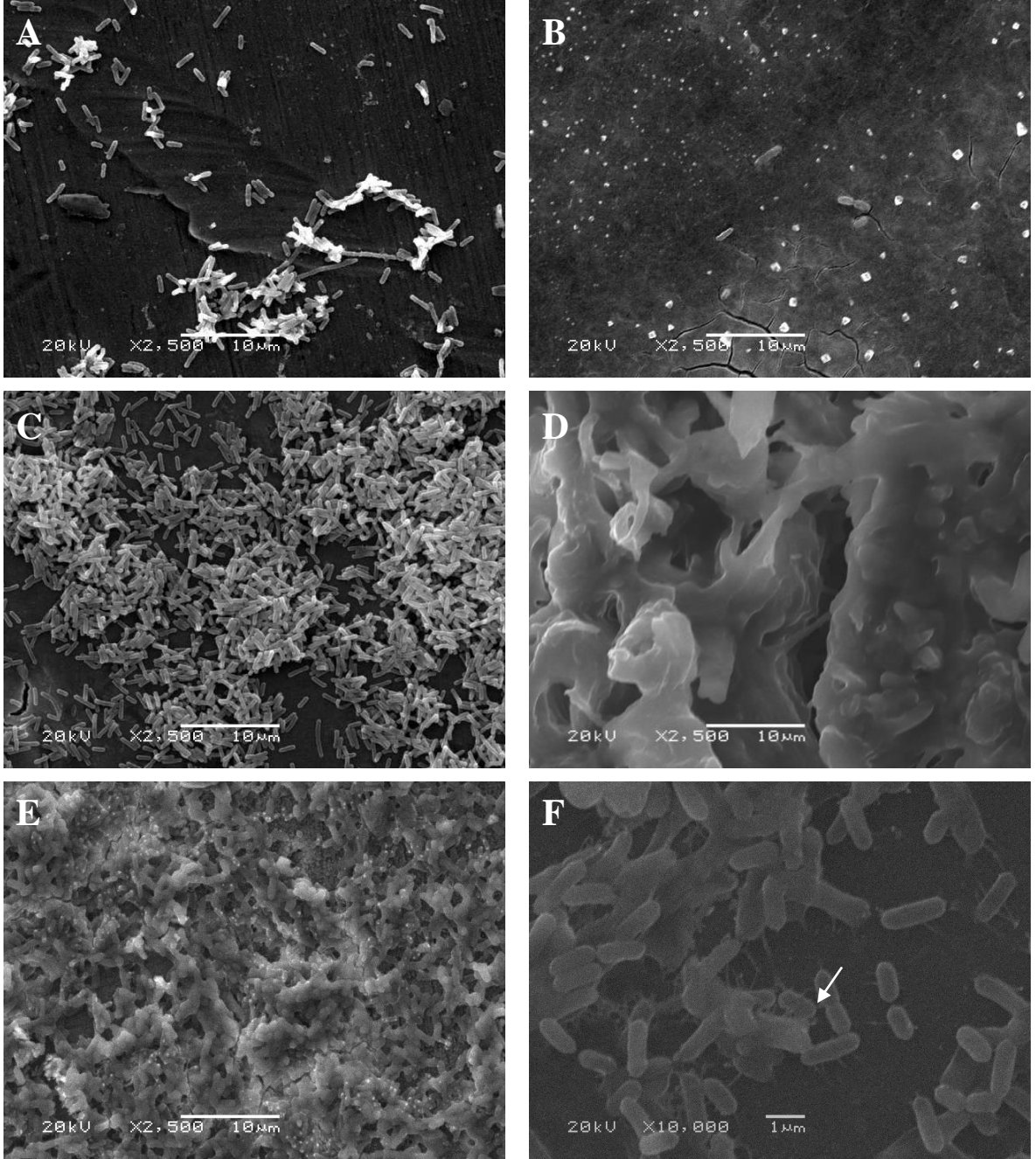
Şekil 4.2 *Salmonella* spp. 8s izolatının altı farklı yüzey üzerinde ve 24 saatte oluşturduğu biyofilm durumunu göstermektedir. Burada da görüldüğü üzere granit, mermer, tahta ve cam yüzeylerde, çelik ve plastik yüzeylere kıyasla daha yoğun biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bu izolat granit, mermer, tahta ve cam yüzeylerde yoğun ve üç boyutlu bir hücre kompoziti şeklinde izlenmiştir (Şekil 4.2 c, d, e, f). Ayrıca (Şekil 4.2 e), granit yüzey üzerinde EPS gömülü bakteri kolonilerini göstermiştir. Ancak çelik ve plastik yüzeylerde biyofilm seyrek hücre agregatları olarak görülmüştür (Şekil 4.2 a, b).



Şekil 4.2. *Salmonella* spp. S8 İzolatının 24. Saatlerde Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) Yüzeyler Üzerindeki SEM Görüntüleri (A, B, C, E Mag x2500; D-F Mag x5000)

Şekil 4.3 24 saatte farklı yüzeyler üzerinde *L. monocytogenes* 13L izolatının biyofilm oluşumunu göstermektedir. Benzer şekilde granit, mermer, tahta ve cam yüzeyler üzerinde üç boyutlu biyofilm ve EPS yapıları tespit edilmiştir. Plastik ve çelik yüzeylerde kolonizasyon daha az görülmüştür. Şekil 4.3 f, *L. monocytogenes* tarafından adezyon ve biyofilm oluşumunu göstermektedir.

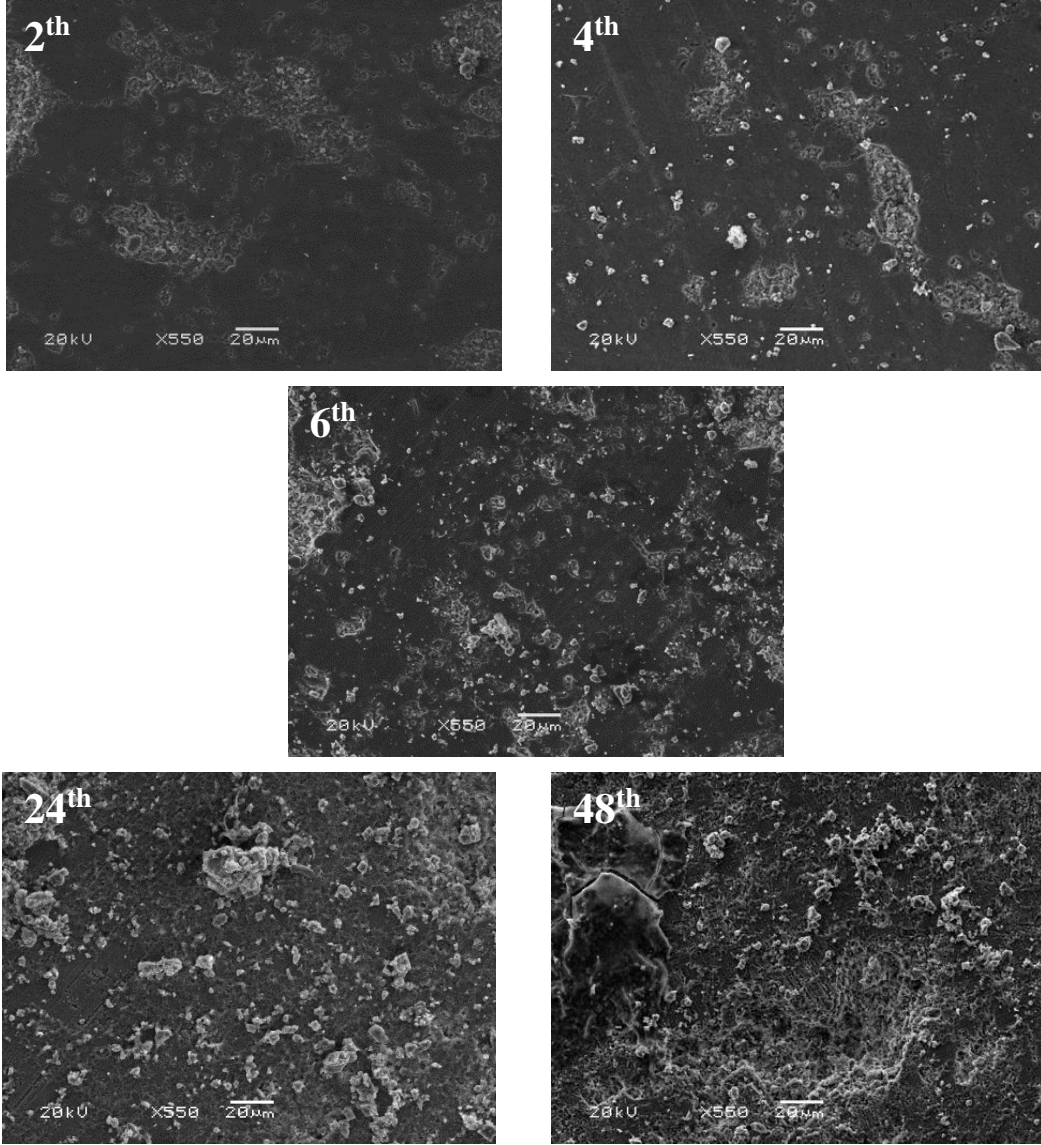




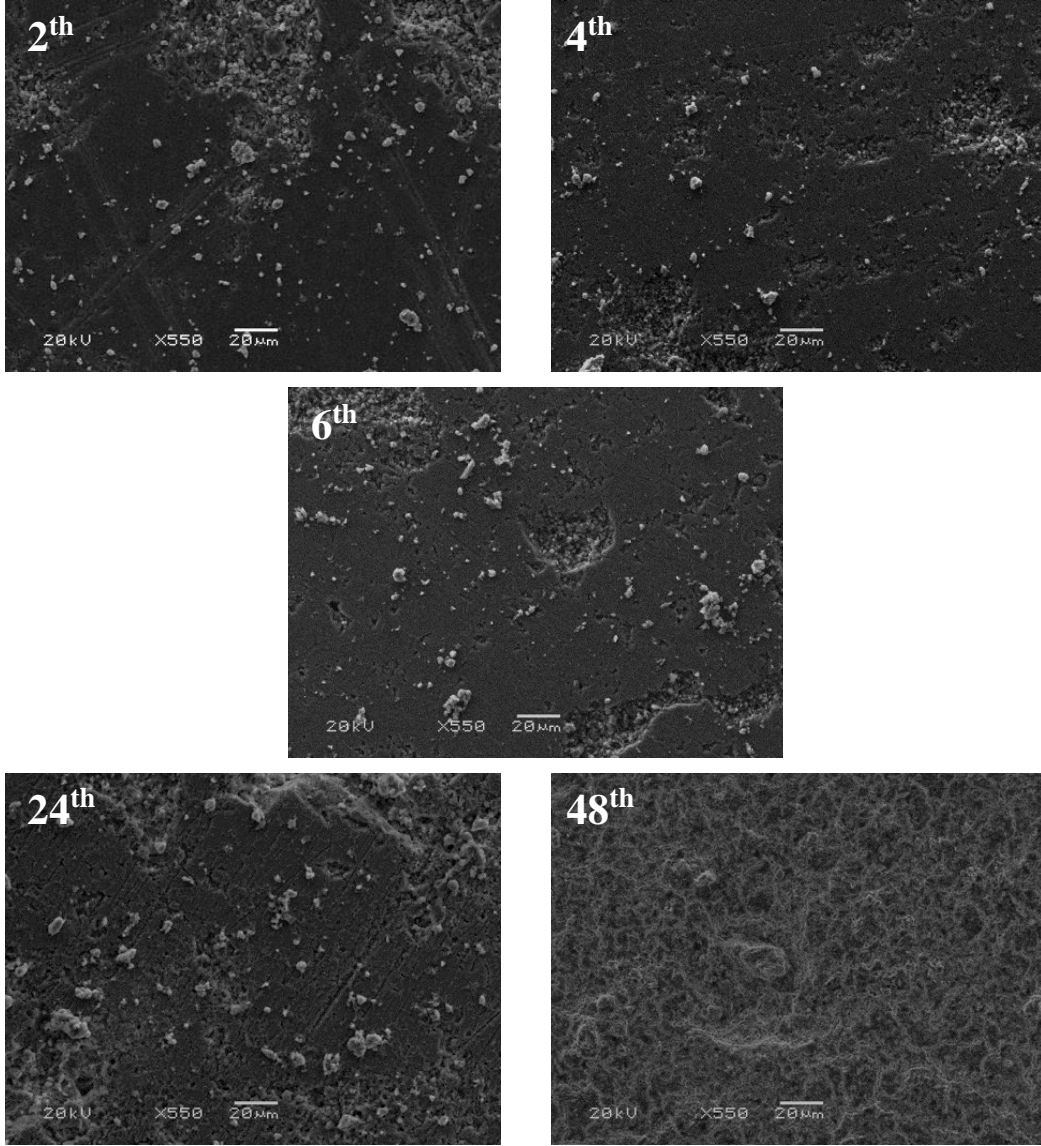
Şekil 4.3. *Listeria monocytogenes* 13L İzolatının 24. Saatlerde Çelik (A), Plastik (B), Mermer (C), Tahta (D), Granit (E) ve Cam (F) Yüzeyle Üzerindeki SEM Görüntüleri (A, B, C, D, E Mag x2500; F Mag x10000)

Çalışmamızda granit yüzeyler üzerinde test izolatlarının biyofilm oluşum ve gelişimleri, 2., 4., 6., 24. ve 48. saatler olmak üzere beş farklı inkübasyon sıcaklığında tayin edilmiştir. Granit yüzey, yüksek biyofilm oluşumuna uygunluğundan dolayı seçilmiştir. SEM ile elde edilen sonuçlara göre *L. monocytogenes* 13L ve *Salmonella* spp. S8 temastan 6 saat sonra granit yüzeye yapışmıştır (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). *Salmonella* spp. S8 izolatu da temastan 6 saat sonra belirgin biçimde yoğun bir aderans göstermiş ancak

yapışan hücrelerin yüzeye dağılımları düzensiz biçimde gözlenmiştir. Bazı alanlarda ise bakteriyal aderans gözlenmemiştir. Bununla beraber 24 ve 48. saatlerde her iki izolat için olgun biyofilm oluşumu izlenmiştir.



Şekil 4.4. *Salmonella* spp. S8 İzolatının Granit Yüzeyler Üzerinde ve Beş Farklı Zaman Aralığında Gösterdiği Biyofilm Oluşumlarının SEM Görüntüleri (Mag x550)



Şekil 4.5. *Listeria monocytogenes* 13L İzolatının Granit Yüzeyler Üzerinde ve Beş Farklı Zaman Aralığında Gösterdiği Biyofilm Oluşumlarının SEM Görüntüleri (Mag x550)

Mikroorganizmaların yüzeylere yapışarak biyofilm oluşturma yetenekleri, gıda endüstrisinde önemli implikasyonlara sebep olmaktadır. Çünkü biyofilmler bu ortamlarda ısrarlı bir bulaşma kaynağı olarak rol alırlar. Eğer mikroorganizmalar gıda temas yüzeylerinden tamamen uzaklaştırılmazlar ise biyofilm oluşturabilir ve biyotransfer potansiyelleri de artabilmektedir. Biyofilm oluşum ve gelişimi spesifik bakteri suşu, materyal yüzey özellikleri ve çeşitli çevresel parametrelerden etkilenmektedir. Biyofilm içindeki hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik bakterilerden çok daha dirençlidirler (Srey vd., 2013).

Bakteriyal hücreler biyofilmlerden gıda ürünlerine kolayca transfer olabildiğinden, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. gibi patojenler tarafından oluşturulan biyofilmler gıda endistrisi açısından önem arz etmektedir (Botticella vd., 2013). Şimdiye kadar, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. izolatlarının farklı gıda işleme yüzeyleri üzerinde gelişerek biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir (Di Bonaventura, 2008). Ancak bu patojenlerce çeşitli gıda temas yüzeylerine yapışma dereceleri ve biyofilm oluşma durumlarındaki farklılıklar ayrıntılı biçimde çalışılmamıştır. Yapılan birkaç çalışmada bakterinin adezyonu hem inert yüzeyin doğası ve hem de bakteriyal yüzeyin özellikleri ile ilişkili bulunmuş; bazı durumlarda da yüzey özellikleri ile bakteriyal adezyon derecesi arasındaki ilişkiyi belirlemek oldukça güç olmuştur (Silva vd., 2008).

Elde edilen sonuçlarımız çalışılan tüm izolatların biyofilm oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgular daha önce yapılan bazı çalışmalarla da uyum göstermektedir (Hood vd., 1997); Wong vd., 1998; Chae vd., 2000). Yine şimdiye kadar yapılan çalışmalarda temas yüzeyi topoğrafyasının bakteriyal adezyonu ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırmada önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Simoes vd., 2010).

Characklis vd. (1990), yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikrobiyal kolonizasyonunda arttığını göstermişlerdir. Howell ve Behrends (2006), mikrobiyal yapışma ile yüzey pürüzlülüğü arasındaki pozitif ilişkiyi rapor etmişlerdir. Bunun sebebini yüzey geriliminin azalması ve pürüzlü yüzeylerde yüzey alanının daha fazla olmasıyla açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da granit, mermer ve tahta gibi pürüzlü yüzeyler diğer yüzeylerden daha yüksek derecede biyofilm göstermişlerdir. Bulgularımıza göre çalışılan her yüzey SEM ile farklı derecelerde pürüzlülük içermiş ve sıralaması tahta > granit > mermer > çelik > plastik > cam olarak belirmiştir. Özellikle tahta büyük porları ve derin yarıkları ile en pürüzlü yüzey olarak gözlenmiştir. Granitin ise daha küçük por ve çatlaklara sahip olduğu görülmüştür. Çelik ve mermer yüzeylerde birçok eğik ve uzun çizgili daha dar yarıklar görülmüştür. Plastik ve cam yüzeylerde yarıklar izlenmemiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan yüzey tiplerinin biyofilm oluşumuna elverişliliği dikkate alındığında sıralama granit > mermer > tahta > cam > çelik > plastik olarak sıralanmaktadır. Yani, tahta çalışmamızdaki en pürüzlü yüzey olmasına rağmen en yüksek biyofilm oluşumu granit ve mermer yüzeylerde gözlenmiştir. Silva ve arkadaşları mutfaklarda yaygın olarak kullanılan 8 materyal üzerinde 10 *L. monocytogenes* izolatının adezyon yeteneğini araştırmışlardır.



Bizim bulgularımıza paralel olarak tüm yüzeylerde yapışma görmüşler; granit ve mermer yüzeylerde daha sıkı bir yapışma ile beraber bunu çelik, cam, siltaşı ve propilen yüzeylerin izlediğini açıklamışlardır (Silva vd., 2008).

Diğer yandan, biyofilm oluşumu sadece yapışma yüzeyinin doğasıyla değil, aynı zamanda bakteriyal hücre ve çevresel faktörlerin karakteristiklerine de bağlıdır (Houdt vd.,2010). Bu yüzden, belli bir materyal üzerindeki biyofilm oluşumunun derecesi için genel bir tahmin yapılamamaktadır. Örneğin, materyalin hidrofobisitesine bağlı olarak, bakteriler yüzeylere farklı derecelerde yapışma gösterirler. Adetunji vd (2011), *L. monocytogenes*'in nutrient broth'a batırılmış cam çelik ve tahta yüzeylerdeki biyofilm oluşumlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında biyofilm oluşumunu en çok tahta yüzeylerde tespit etmiş, bunu çelik ve cam yüzeyler izlemiştir. Araştırmacılar bu sonucu tahta yüzeylerin sahip olduğu yüksek hidrofobisiteye bağlamışlardır.

Çelik ve cam gibi yüzeyler yüksek yüzey enerjisine sahip olduklarından daha hidrofiliktirler. Araujo ve arkadaşları süt işletmelerinden izole ettikleri *Bacillus cereus* suşlarının çelik, granit ve cam yüzeyler üzerindeki adezyonunu araştırmışlardır. Granit ve çelik gibi hidrofobik yüzeylerin adezyonunun, cam gibi hidrofilik kabul edilen yüzeylere göre daha yüksek adezyon gösterdiğini rapor etmişlerdir (Araujo vd., 2010). Bizim çalışmamızda da tahta ve çelik gibi hidrofobik yüzeylerde daha güçlü adezyon ve biyofilm oluşumu saptanmıştır. Diğer yandan, tüm plastikler doğal olarak hidrofobik kabul edilir fakat yüzey karakterini değiştirmek için kullanılan ayıraçlarla hidrofilik hale getirilirler. Çalışmamızda PP5 plastik ve cam materyaller kullanılmıştır ve bu sonuçlar yüzey materyalinin hidrofobisitesinin başlangıç adezyonu ve biyofilm gelişimini etkilediğini desteklemektedir.

SEM sonuçlarımıza göre, yüzeylerin izolatlarla temasından 6 saat sonra başlangıç adezyonu başlamıştır. Gerçek olgun biyofilm oluşumu ise 24-48. saatlerde ortaya çıkmıştır. Leonhard ve arkadaşları, pürüzlü yüzeylerin başlangıç adezyonunu uyarabildiğini ancak biyofilm oluşumunun ileri evrelerinde çok etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca uzun dönemli biyofilm oluşumunda yüzey yapısının etkisiz olduğunu açıklamışlardır (Leonhard vd., 2014). Çalışmamızdan elde edilen verilerde biyofilm oluşum ve gelişimleri 48 saate

kadar incelenmiştir ancak 48. saatte bile plastik ve cam gibi düz yüzeyler, pürüzlü yüzeylere oranla daha zayıf bir biyofilm göstermişlerdir.

Flagella ve fimbria gibi bakteriyel uzantılar, bakteriyel hareketten sorumlu yapılardır ve yüzeyler üzerinde gelişmeye ve biyofilmin yayılmasına katkıda bulunurlar. Aynı zamanda bakteriyel hücre yüzeyinin hidrofobisitesine de katkıda bulunarak yapışmaya yardım ederler. Bilindiği gibi *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunda flagellar hareket kritik bir önem taşımaktadır (Houdt vd., 2010). Bizim çalışmamızda da *L. monocytogenes* hem tüp aderans hem de mikrotitre plak yönteminde *Salmonella* spp. isolatlarına göre daha güçlü bir biyofilm göstermiştir. Diğer yandan verilerimize göre cam ve plastik yüzeylerde diğer yüzey materyallerine göre daha az biyofilm oluşumu izlenmiştir. Burada yüzey materyalinin biyofilm oluşumuna etkisi konusunda bir çelişki olmasına rağmen, flagella ve fimbria gibi yapıların bakteriye ilave bir hidrofobisite kazandırdığını düşünmekteyiz.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. türlerinin cansız yüzeyler üzerine adezyonu ve biyofilm oluşturmaları pek çok faktöre bağlı bir olaydır. Bu bakteriler tarafından biyofilm oluşumu yüzey çeşidi, inkübasyon süresi ve hidrofobisite gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Biyofilm oluşumunun engellenmesinde en önemli nokta bakterilerin yüzeye tutunmalarını engellemek için etkin ve düzenli bir temizlik işleminin gerçekleştirilmesidir. Elde ettiğimiz veriler 24. saatte olgun biyofilm oluşumunu gösterdiğinden yapılacak temizlik işlemleri günde en az iki kez olacak şekilde planlanmalıdır. Ayrıca gıda endüstrisinde kullanılan yüzeyler zaman içerisinde aşınma, çizilme ya da yarıma gibi sebeplerle bozulabileceğinden biyofilm oluşumuna zemin hazırlayabilirler. Bu sebeple kullanılan malzemelerin düzenli aralıklarla yenilenmesi biyofilm ile mücadelede büyük önem taşımaktadır. Granit ve mermer, evsel kullanımda ve gıda işleme basamaklarında çok yaygın kullanılan yüzeyler olmasına rağmen biyofilm oluşumu için çok elverişli yüzeylerdir. Bu sebeple, etkin dezenfeksiyon imkânlarının kullanılamayacağı yüzeylerde tercih edilmeyebilirler. Plastik ve cam yüzeylerin kullanımı ise biyofilm oluşumu bakımından daha uygun olabilir. Yapılacak ayrıntılı çalışmalar, biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerine mikrobiyolojik ve fizyokimyasal faktörlerin daha iyi anlaşılmasına ışık tutacaktır.

**Bu proje Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (2015-910).**

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, M.R., Moss, M.O., 1995, *Salmonella*. In: Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p.192-200.
- Adetunji, Victoria O., Tajudeen, O. Isola., 2011, Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* on Wood, Steel and Glass Surfaces, Global Veterinaria 6.1, p.6-10.
- Akan, E., Kınık Ö., 2014, Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi, Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 14 s.42-51.
- Akkaya, L., Alişarlı, M., 2006, Afyonkarahisar' da Tüketime Sunulan Kremalı Pastalarda *Listeria* Türlerinin Varlığının Belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17,1-2, s.93-97.
- Aksu, F., Ünver, A., Uran, H., 2011, Biyofilm Oluşumu ve Gıda Güvenliği Açısından Önemi, Gıda Dergisi, 07, s.70-73.
- Al-shadefat, B., 2011, Tüketim Sürecinde Döner Kebaplarda *Salmonella spp.* Varlığının Araştırılması, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, s7-12.
- Altun, H.U., Şener, B., 2008, Biyofilm İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci, Hacettepe Tıp Dergisi, 39, s.82-88.
- Anonim a, 2016, *Salmonella*, <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/943105030.pdf>, erişim tarihi: 05.11.2016.
- Anonim b, 2016, İmage *salmonella typhimurium*, <http://stock-picture.com/picture%20of%20gram%20negative%20salmonella%20typhimurium>, erişim tarihi: 18.11.2016.
- Anonim c, 2016, *Listeria monocytogenes*'in Mikroskopik Görüntüsü, <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm01.html>, erişim tarihi: 04.11.2016.
- Araújo, E.A., Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Carvalho, A.F., Sá Silva, C. A., vd., 2010, Control of Microbial Adhesion as a Strategy for Food and Bioprocess Technology, Food and Bioprocess Technology,3(3), p.321-332.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arda, M.,Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., vd., 1999, Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi. Ankara. 362s.
- Arnold, J.W., Silver, S., 2000, Comparison of Poultry Processing Equipment Surfaces for Susceptibility to Bacterial Attachment and Biofilm Formation, Poul. Sci, 79, p.1215-1221.
- Ata, Z., Aydın, N., 2008, Ankara Bölgesi'ndeki Tavukçuluk İşletmelerinden *Salmonella* spp. İzolasyonu, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 55, s.161-166.
- Avcı, M.K., 2009, Quorum Sensing Odaklı Yenilikler ve Biyoteknolojik Uygulamalar, MBG 617 Biyoteknolojide yeni gelişmeler, s.1-14.
- Bassler, B.L., 1999, How Bacteria Talk to Each Other, Regulation of Gene Expression By Quorum Sensing, 2, p.582-87.
- Bell, C.,Kyriakides, A., 2002, *Salmonella*. In: Foodborne Pathogens Ed.:Blackburn, Clive De W., McClure, P.J. Woodhead Publishing, Boca Raton, p.307-331.
- Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M., Güdücüoğlu, H., 2006, Et ve Et Ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in İzolasyonu, Van Tıp Dergisi, 13,2, s.36-41.
- Botticella, Giuseppe, vd, 2013, *Listeria monocytogenes*, Biofilm Formation and Fresh Cut Produce, Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them, Science, Technology and Education, Formatex1, p.114-123.
- Chae, Seok, M., Schraft, H., 2000, Comparative Evaluation of Adhesion and Biofilm Formation of Different *Listeria monocytogenes* Strains."International Journal of Food Microbiology, 62.1, p.103-111.
- Characklis, William, G., Kevin, C., 1990, Marshall, Biofilms.
- Christensen, G.D., Bisno, A.L., Simpsom, W.A., Beachey, E.H., 1982, Adherence of Slime Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces, Infect Immun, 37, p.318-326.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial Biofilms A Common Cause Of Persistent Infections Science, 284, s.1318-1322.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cotter, P.D., Gaban, C.G.M., Hill, C., 2000, Analysis of The Role of *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase Operon in The Acid Tolerance Response, International Journal of Food Microbiology, 60, p.137-146.
- Çolak, F., Dıġrak, M., Aksoy, Z., 2008, Kahramanmaraş'ta Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinde *Listeria* Türlerinin Patojenitesi'nin Belirlenmesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 11,1, s.8-12.
- D'aoust, J.Y., 1997, *Salmonella* Species. In: Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, Ed.: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., ASM Press, ashington D.C., p.129-157.
- Deniz, G.Y., Ulukanlu, Z., 2012, Ağrı İli Merkezinde Hazır Olarak Satışa Sunulan Kıyma Örneklerinin *Salmonella* spp. Yönünden İncelenmesi, 1(2), s.86-95.
- Di Bonaventura, G., vd, 2008, Influence of Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Various Food-Contact Surfaces, Relationship with Motility and Cell Surface Hydrophobicity, Journal of Applied Microbiology 104.6, p.1552-1561.
- Ekici, K., İşleyici, Ö., Sağun, E., 2004, Süt ve Süt Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15,1-2, s.97-101.
- Evirgen, Ö., 2005, *Listeria monocytogenes* İnfeksiyonu; Kliniği, Tanı ve Tedavi Özellikleri, Van Tıp Dergisi, 12(1), s.32-35.
- Farber, J.M., 1991, *Listeria monocytogenes*. AOAC, 74(4), p.701-704.
- Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W., 1996, The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial Processing. J. Appl. Bacteriol, 81, p.641-650.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008, Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces, Progress in Natural Science, 18, p.1049-1056.
- Gellin, B.G., Broome, C.V., 1989, Listeriosis, JAMA, 261(9), p.1313-1320.
- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E., vd., 2006, Surveillance of Human Listeriosis in France, Euro Surveillance, 11(6), p.79-81.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gülgör, G., Korukluoğlu, M., 2014, Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılaması (Quorum Sensing), Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2) s.83-92.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009, Biyofilmler: Yüzeyledeki Mikrobiyal Yaşam, Derleme, 34(2), s.165-173.
- Halkman, A.K., 2013, Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, s.16-38.
- Hitchins, A.D., 2003, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods Bacteriological Analytical Manual Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>, erişim tarihi: 31.03.3009.
- Hood, Scott, K., Edmund, A., Zottola, 1997, Adherence to Stainless Steel by Foodborne Microorganisms During Growth in Model Food Systems."International Journal of Food Microbiology37.2, p.145-153.
- Houdt, V., Rob, Chris W., Michiels, 2010, Biofilm Formation and the Food Industry, a Focus on the Bacterial Outer Surface, Journal of Applied Microbiology109.4, p.1117-1131.
- Howell, D., Behrends, B., 2006, A Review of Surface Roughness in Antifouling Coatings Illustrating the Importance of Cutoff Length. Biofouling, 22(6), p.401-410.
- Kara, R., 2007, Doğal Koşullarda ve Isıl İşlem Uygulanarak Üretilen Türk Sucuklarında *Salmonella typhimurium* 'un Gelişimi, s.16-27.
- Kelen, D.V.,Lindsay, J.A., 1990, Differential Hemolytic Response of *Listeria monocytogenes* Strains on Various Blood Agar. J. FoodSafety, 11, p.9-12.
- Koçan, D.,Halkman, A.K., 2006, *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 31 (3), s.133-140.
- Kolb-Maurer, A., Gentshev, I., Fries, H.W., Fiedler, F., Brocker, E.B., vd., 2000. *Listeria monocytogenes*-Infected Human Dendritic Cells, Uptake and Host Cell Response,Infect. Immunity. 68:3680-3688.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leonhard, M., Zatorska, B., Moser, D., Bertl, K., Bigenzahn, W., 2014, Impact of Surface Roughness on Long-Term Candida Biofilm Colonization of Prosthetic Silicone, A Pilot Study Hard Tissue, 22;3(1):6.
- Lim, B.K.,Thong, K.L., 2009, Application of PCR-Based Serogrouping of Selected *Salmonella* Serotypes in Malaysia. J Infect Dev Ctries, 3:420-8.
- 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 İsolate, J Appl Microiol, 92, p.352-361.
- Lorber, B., 1997, Listeriosis. ClinInfectDis, 24:1
- McLauchlin, J.,Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis, A Review of Hazard Characterisation forUse in Microbiological Risk Assessment of Foods, International Journal of Food Microbiology, 92, p.15-33.
- Mu-oz N., Diaz-Osorio M., Moreno J., Sánchez-Jiménez M., Cardona-Castro N., 2010, Development and Evaluation of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Procedure to Clinically Type Prevalent *Salmonella enterica* Serovars. J MolDiagn,12:220-5.
- Norrung, B., 2000, Microbiological Criteria for *Listeria monocytogenes* in Foods Under Special Consideration of Risk Assessment Approaches. International Journal of Food Microbiology 62, p. 217–221.
- Oktaý, H.İ., 2005, Peynir, Tereyağı ve Kumpirde Patojenik Mikrofloranın Belirlenmesi ve Bazı Patojenlerin Vıdas Yöntemi ile Tayini, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.14-16.
- Poyraz, İ., Ören, S., 2015, Adapazarı Bölgesi Bazı Broiler Tipi Tavukçuluk İşletmelerinden *Salmonella* İzolasyonu ve Tiplendirilmesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2,(1), s.61-68.
- 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, p.357–376.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sağlık Bakanlığı, 2015, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS) *Salmonella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı, Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu, B-MT-08, s.5-6.
- Sancak, Y.C., İşleyici, Ö., Sağun, E., 2007, Van'da Tüketime Sunulan Bazı Et Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı, 18,1, s.93-99.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J., 2008, Adhesion to and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. Journal of Food Protection, 71(7), p.1379-1385.
- Simoës, Manuel, Lúcia, C., Simões, Maria, J., Vieira, 2010, A Review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies, LWT-Food Science and Technology, 43.4, p.573-583.
- Solmaz, L., Çetinkaya, F., Soyutemiz, G.E., 2007, İhracata Yönelik Üretilen Bazı Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 33,2, s.1-11.
- Srey, O., Kabir, I., Ha, S., 2013, Biofilm Formation in Food Industries, A Food Safety Concern Food Control, 31, p.572-585.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000, A Modified Microtiter-plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation, Journal of Microbiological Methods, 40(2), p.175-179.
- Sylla, Y., Faille, C., Benezech, T., Removal Kinetics of *Bacillus cereus* Biofilms from Food Equipment Cleaned in Place, [www.icef11.org/content/papers/hdo/HDO1271.pdf](http://www.icef11.org/content/papers/hdo/HDO1271.pdf), erişim tarihi: 12.11.2013.
- Şakan, Ö., Aral, E.M., Muhktar, M., Aden, A., Aksoy, A., vd., 2016, Türkiye'deki Broyler Tavuk İşletmelerinden İzole Edilen *Salmonella* Serovarlarının Antimikrobiyel Direnç Durumu, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 63, s.1-6.
- Şanlıbaba, P., Uymaz, B., 2015, Gıdalarda *Listeria monocytogenes* 'in Biyokontrolünde Faj Uygulaması, Akademik Gıda, 13(1), s.81-88.
- Tekay, F., Özbek, E., Kazancı, E., Okur, N., Demirel M., vd., 2014, *Listeria monocytogenes* Serotip 4b'ye Bağlı Neonatal Sepsis: Bir Olgu ve Literatür Derlemesi, 41 (3) , s.599-602.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- 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, s.1-133.
- TSE, 2005, Mikrobiyoloji Gıda ve Hayvan Yemleri *Salmonella* Türlerinin Belirlenmesi İçin Yatay Yöntem, TS EN ISO 6579.
- Tunail, N., 2000, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Genişletilmiş 2. Baskı, 522s.
- Türkyılmaz, S., Savaşan, S., Kırcan, Ş., Kaya, O., 2007, Tavuklarda *Salmonella enteritidis* Enfeksiyonlarının Bakteriyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Teşhisi. 33 (2), s.23-33.
- 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), p.1117-1131.
- Wang, G.H., Yan, K.T., Feng, Y.M., Chen, S.M., Lui, A.P., vd., 1992, Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Retail Meats in Beijing. J. Food Protect, 55, (1), p.56-58.
- Wong, Amy, C., Lee, 1998, Biofilms in Food Processing Environments, Journal of Dairy Science 81.10, p.2765-2770.
- Yavuz, M., Korukluoğlu, M., 2010, *Listeria monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 24(1), s.1-10.
- Yılmaz, H., Karahan A.G., Başyigit G., 2015, Quorum Sensing Mechanism in Lactic Acid Bacteria, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72(1), s79-90.