

**ÇIĞ SÜT VE PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LISTERIA*  
TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ**

**Havva YILDIRIM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2013  
ANKARA**

Havva YILDIRIM tarafından hazırlanan “ÇİĞ SÜT VE PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LISTERIA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Nihal YÜCEL

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Demet ÇETİN

.....

Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, G. Ü.

Prof. Dr. Nihal YÜCEL

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Tez Savunma Tarihi: 16/01/2013

Bu tez ile G. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Havva YILDIRIM

# ÇİĞ SÜT VE PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LISTERIA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Havva YILDIRIM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2013

## ÖZET

Bu çalışmada, Ankara’da tüketime sunulan 80 çiğ süt ve 80 peynir örneğinde *Listeria* türlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla steril koşullar altında alınan örnekler kısa sürede laboratuvara getirilmiş ve aynı gün işleme alınmıştır. Örneklerden *Listeria* türlerinin izolasyonu ISO 11290-1/A1-2004’de önerilen yöntemle yapılmıştır. Araştırmada incelenen 80 çiğ süt ve 80 peynir örneğinden 15 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 11’i *Listeria innocua*, 3’ü *Listeria grayi* ve 1’i *Listeria welshimeri* olarak tanımlanmıştır.

Biyofilm çalışma yöntemi olarak sıklıkla kullanılan standart mikropate (96 kuyucuklu plastik mikropate) metodu ile çalışılmıştır. Bu yöntemle yapılan çalışmada *Listeria* spp. inoküle edilmiş triptic soy broth (TSB), TSB+%1 NaCl ve TSB+%1 glikoz besiyerleri 30°C’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen 15 *Listeria* izolatının TSB’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 9’unun, 48 saat sonra 5’inin, 72 saat sonra ise 1’inin iyi olarak tutunduğu tespit edilmiştir. Aynı izolatlar 30°C’de TSB+%1 NaCl’de 24 saat sonra 5 izolatın, 48 saat sonra 4 izolatın ve 72 saat sonra ise 2 izolatın iyi tutunduğu bulunmuştur. TSB+%1 glikoz’lu ortamda ise 30°C’de 24

saat sonra 3 izolatın, 48 saat sonra 6 izolatın ve 72 saat sonra ise 1 izolatın iyi tutunduğu tespit edilmiştir.

30°C'de TSB'de inkübasyon sonrası çiğ süt örneklerinden izole edilen 5 no'lu *L. innocua*'da 24 saat sonra tutunma 1,016 bulunurken; peynir örneklerinden izole edilen 15 no'lu *L. grayi*'de ise 1,101 ile en yüksek tutunma tespit edilmiştir.

30°C'de TSB+%1 NaCl'de inkübasyon sonrası çiğ süt örneklerinden izole edilen 7 no'lu *L. innocua*'da 24 saat sonra tutunma 0,459 bulunurken; peynir örneklerinden izole edilen 15 no'lu *L. grayi*'de ise 0,617 ile en yüksek tutunma tespit edilmiştir.

30°C'de TSB+%1 glikoz'da inkübasyon sonrası çiğ süt örneklerinden izole edilen 7 no'lu *L. innocua*'da 24 saat sonra tutunma 0,253 bulunurken; peynir örneklerinden izole edilen 11 no'lu *L. grayi*'de ise 0,420 ile en yüksek tutunma tespit edilmiştir.

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen 15 *Listeria* izolatının 48 saatlik inkübasyon sonrasında kuvvetli derecede biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası tutunmada TSB+%1 glikoz en iyi besi ortamı olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeninin biyofilm oluşumunda bakteri hücreleri tarafından polisakkarit bazlı ekzopolisakkarit matriks üretiminin olduğu düşünülmüştür.

**Bilim Kodu** : 203.1.010  
**Anahtar Kelimeler** : *Listeria* türleri, Biyofilm oluşumu, Çiğ süt, Peynir  
**Sayfa Adeti** : 107  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Nihal YÜCEL

**INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION BY *LISTERIA* SPP.  
ISOLATED FROM RAW MILK AND CHEESE SAMPLES**

**(M. Sc. Thesis)**

**Havva YILDIRIM**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**January 2013**

**ABSTRACT**

**In this study, existence of *Listeria* species was investigated in 80 raw milk and 80 cheese samples which were presented to consumption in Ankara. For this purpose, samples were collected at sterile conditions, brought to the laboratory immediately and analysed at same day. *Listeria* species were isolated from the samples according to ISO 11290-1/A1-2004 method. 15 *Listeria* isolates obtained from collected 80 raw milk and 80 cheese samples. 11 of these isolates were identified as *Listeria innocua*, 3 of them were identified as *Listeria grayi* and 1 of them was identified as *Listeria welshimeri*.**

**At biofilm study, widely used standard microplate (96-welled plastic microplate) technique was used. In this study; tryptic soya broth (TSB), TSB+1% NaCl, TSB+1% glucose media were inoculated with *Listeria* spp. and incubated at 30°C for 24, 48 and 72 hours.**

**Out of 15 *Listeria* isolates 9 isolates from raw milk and cheese samples were determined to show tight attachment after 24 hours 5 isolates after 48 hours, 1 isolate after 72 hours at 30°C. 5 isolates were determined to show tight attachment after 24 hours, 4 isolates after 48 hours, 2 isolates after 72 hours at 30°C in TSB+1% NaCl medium. 3 isolates were determined to show tight**

attachment after 24 hours, 6 isolates after 48 hours and 1 isolate after 72 hours at 30°C in TSB+1% glucose medium.

In TSB medium, isolate number 5 *L. innocua*'s attachment isolated from raw milk samples were evaluated 1.016 while isolate number 15 *L. grayi*'s attachment isolated from cheese samples were evaluated at maximum value of 1.101 at 30°C after 24 hours.

In TSB+1% NaCl medium, isolate number 7 *L. innocua*'s attachment isolated from raw milk samples were evaluated 0.459 while isolate number 15 *L. grayi*'s attachment isolated from cheese samples were evaluated at maximum value of 0.617 at 30°C after 24 hours.

In TSB+1% glucose medium, isolate number 7 *L. innocua*'s attachment isolated from raw milk samples were evaluated 0.253 while isolate number 11 *L. grayi*'s attachment isolated from cheese samples were evaluated at maximum value of 0.420 at 30°C after 24 hours.

After 48 hours of incubation, the 15 *Listeria* isolates which were isolated from raw milk and cheese showed a strong attachment to microtiter. After 48 hours of incubation the TSB+1% glucose medium was the best medium for attachment. This is because of the exopolysaccharide which is produced by bacteria during biofilm formation.

Science Code : 203.1.010  
Key Words : *Listeria spp.*, Biofilm formation, Raw milk, Cheese  
Page Number : 107  
Adviser : Prof. Dr. Nihal YÜCEL

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca her türlü bilgi ve deneyiminden faydalandığım, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, teşvikleriyle beni destekleyen saygı değer hocam Prof. Dr. Nihal YÜCEL'e, yine çalıőmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini yanımda hissettiğim Prof. Dr. Sumru ÇITAK ve Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN'a, laboratuvar çalıőmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru Yılmaz'a; bana her koşulda destek olan, büyük özveriler gösteren aileme, bir arada çalıştığım laboratuvar arkadaşlarım Ebru AVCI, Kübra SEVİMLİ, Selvi ŞAHİN, Burcu ÇETİNGÜRBÜZ, Elif ORHAN ve Tuğba ÖZKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. <i>Listeria</i> .....	3
2.1.1. <i>Listeria</i> ' ların sınıflandırılması.....	3
2.1.2. <i>Listeria</i> ' ların genel özellikleri.....	3
2.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in tarihçesi .....	6
2.1.4. <i>Listeria</i> türlerinin koloni yapısı ve morfolojisi .....	7
2.1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in biyokimyasal özellikleri.....	8
2.1.6. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in gelişmesi ve canlılığını sürdürmesi .....	10
2.1.7. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in patojenitesi.....	12
2.1.8. Klinik önemi.....	16
2.1.9. <i>Listeria monocytogenes</i> ' in antibiyotik duyarlılığı .....	18
2.1.10. Sütlerde <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19

2.2. Biyofilm.....	20
2.2.1. Biyofilmin tarihçesi.....	20
2.2.2. Biyofilmin tanımı ve önemi .....	21
2.2.3. Biyofilm oluşum mekanizması.....	24
2.2.4. Biyofilm oluşumun klinik önemi .....	27
2.2.5. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi .....	31
3. MATERYAL VE METOD .....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Çiğ süt ve peynir örnekleri .....	35
3.1.2. <i>Listeria</i> türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyerleri.....	35
3.2. Metod.....	37
3.2.1. Koloni değerlendirme ve <i>Listeria</i> türlerinin teşhisi.....	38
3.2.2. <i>Listeria</i> türlerinin teşhisi ve biyokimyasal ayrımında kullanılan testler .....	39
3.3. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen <i>Listeria</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Ölçülmesi .....	50
3.3.1. Mikroplate ile biyofilm ölçümü .....	50
4. BULGULAR.....	58
4.1. <i>Listeria</i> Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları.....	58
4.2. Mikroplate İle Biyofilm Ölçümü Sonuçları.....	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	85
KAYNAKLAR .....	94
ÖZGEÇMİŞ .....	107

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>Listeria</i> 'ların cins düzeyinde ayırt edici bazı özellikleri.....	49
Çizelge 3.2. <i>Listeria</i> türlerinin identifikasyonunda kullanılan testler.....	49
Çizelge 3.3. TSB besiyerinde biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan aralıklar .....	55
Çizelge 3.4. TSB+% 1 NaCl besiyerinde biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan aralıklar .....	56
Çizelge 3.5. TSB+% 1 glikoz besiyerinde biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan aralıklar .....	57
Çizelge 4.1. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> izolatlarının çalışılan örnek sayısına göre dağılımı .....	58
Çizelge 4.2. <i>L. monocytogenes</i> ve <i>L. innocua</i> ATCC suşları.....	58
Çizelge 4.3. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> izolatlarının türlere.....	59
Çizelge 4.4. İzole edilen <i>Listeria</i> türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımı .....	60
Çizelge 4.5. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinde TSB kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları .....	61
Çizelge 4.6. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 <i>Listeria</i> izolatının TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	64
Çizelge 4.7. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinde TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları .....	65
Çizelge 4.8. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 <i>Listeria</i> izolatının TSB+% 1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	68

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.9. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinde TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları .....	69
Çizelge 4.10. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 <i>Listeria</i> izolatının TSB+% 1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	72
Çizelge 4.11. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 <i>Listeria</i> türlerinin 30°C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	73
Çizelge 4.12. Çiğ süt örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdeleri .....	73
Çizelge 4.13. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	75
Çizelge 4.14. Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi .....	75
Çizelge 4.15. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 <i>Listeria</i> türlerinin 30°C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri .....	77
Çizelge 4.16. Çiğ süt örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi.....	77
Çizelge 4.17. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 <i>Listeria</i> türlerinin 30°C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	79
Çizelge 4.18. Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi .....	79
Çizelge 4.19. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri .....	81
Çizelge 4.20. Çiğ süt örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi.....	81

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.21. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 <i>Listeria</i> türlerinin 30°C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri.....	83
Çizelge 4.22. Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> türlerinin 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi .....	83
Çizelge 4.23. <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19114) ve <i>L. innocua</i> (ATCC 33090) suşlarının 30°C'de TSB, TSB+%1 NaCl ve TSB+% 1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri .....	84

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. <i>L. monocytogenes</i> 'in elektron mikroskop ve ışık mikroskop görüntüsü ....	8
Resim 3.1. Katalaz Testi .....	39
Resim 3.2. Oksidaz (+), oksidaz (-) .....	40
Resim 3.3. Hareket Testi .....	40
Resim 3.4. CAMP testinin Kanlı Agar' da görünümü .....	42
Resim 3.5. Karbonhidrat fermentasyon testi.....	45
Resim 3.6. Metil Red Testi .....	46
Resim 3.7. Voges-Proskauer Testi .....	47
Resim 3.8. <i>Listeria</i> spp. tanımlanmış kitler .....	48
Resim 3.9. <i>Listeria</i> izolatlarının mikropate içerisinde 30 °C' de 24 saatlik inkübasyonu.....	51
Resim 3.10. Yıkama sonrası metanol fiksasyonu .....	52
Resim 3.11. Kristal viyole ile yapılan boyama .....	53
Resim 3.12. Boyama sonrası kurutulan mikropatelerin tabanındaki biyofilm oluşumunun görünümü.....	53
Resim 3.13. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücrelerinin tuttuğu boyanın geri çözdürülmesi.....	54

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Biyofilmdeki oksijen dağılımı .....	22
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum mekanizması .....	24

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Cfu</b>	Colony forming unit
<b>°</b>	Derece
<b>gr</b>	Gram
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>Log</b>	Logaritma
<b>Lt</b>	Litre
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>μ</b>	Mikron
<b>μg</b>	Mikrogram
<b>mg</b>	Miligram
<b>nm</b>	Nanometre
<b>°C</b>	Derece Santigrat
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>%</b>	Yüzde
<b>pH</b>	Asitlik değeri
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>dk</b>	Dakika
<b>-</b>	Negatif
<b>+</b>	Pozitif
<b>TSAYE</b>	Yeast Ektraktlı Triptik Soy Agar
<b>HFB</b>	Half Fraser Broth
<b>FB</b>	Fraser Broth



<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Supp.</b>	Supplement
<b>ATM</b>	Atmosfer Basıncı
$\square_w$	Su aktivitesi (water activity)
<b>CF</b>	Clumbing factor
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standarts Instute
<b>DNase</b>	Deoksiribonükleaz
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DEĞ</b>	Değişken
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L.innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>
<i>L. seeligeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>L.welchimeri</i>	<i>L. welchimeri</i>
<i>L. denitrificans</i>	<i>Listeria denitrificans</i>
<i>L. murayi</i>	<i>Listeria murayi</i>
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ISO</b>	İnternational Organization for Standardization
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GRAS</b>	Generally Recognised As Safe
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Hidrojen Sülfür
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
<b>kob</b>	Koloni Oluşturan Birim
<b>KOH</b>	Potasyum Hidroksit
<b>MHA</b>	Müller hinton agar
<b>MPN</b>	Most Probable Number (En Muhtemel Sayı)

**Simgeler****MR****VP****TNase****TSA****Açıklama**

Metil Red

Voges Proskauer

Termonükleaz

Trypticase soy agar

## 1. GİRİŞ

Biyofilmler bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanır. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen ekzopolisakkarit ya da EPS adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur [Leone ve ark., 2006; Fujishige ve ark., 2006; Çiftçi, 2005].

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Klinik, çevresel ve endüstriyel alanlarda bulunan bakteriler sıklıkla biyofilm oluşumuna yol açarlar. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hümmresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir [Donlan, 2002].

Biyofilmler hem endüstriyel, hem de sağlık üzerine olan bu etkileri nedeniyle gıda sanayinde oldukça önemlidir. Mikrobiyal biyofilmlerin; aletlerin üzerinde oluşturdukları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıkları önemli maddi kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. İnfeksiyon hastalıklar ile biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp iç zarı iltihabı, periodontit, kistik fibrioz gibi hastalıklara neden olur [Fujishige ve ark., 2006; Donlan ve Costerton, 2002].

Biyofilm tabakası, endüstriyel ve evsel su sistemlerinde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Süt ve diğer gıda sanayilerinde biyofilm, ısının yüzeyden akışını geciktirmesi, yüzeydeki sıvının sürtünme direncinin artması ve yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlar yaratmaktadır [Halam ve ark., 2001; Kumar ve Anand, 1998].

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların çok iyi organize edilmiş bir gelişim süreci sonucu oluşturdukları kompleks organizma toplulukları olarak görülebilir. Biyofilmlerin oluşumunda çoğu mikroorganizma için genel mekanizma aynı olsa da, türlere spesifik davranışlar her bir mikroorganizmanın kendine özel değerlendirilmesi gerektiğini de vurgulamaktadır. Saf kültürlerin yanı sıra, biyofilm oluşumu farklı birçok türün kombinasyonlarından da kaynaklanabileceği için bunlar arasındaki ilişkilerin iyi anlaşılması da şarttır [Gün ve Ekinci, 2009].

Bu çalışmada, *Listeria*'ların etkili yüzey kolonizerleri olmalarının yanı sıra, su arıtma ve gıda işletim sistemlerinde biyofilm oluşumunda önemli olmaları nedeniyle çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria*'ların cins ve tür ayrımı yapıldıktan sonra biyofilm oluşumu incelenmiş ve sonuçların ileriki yıllarda yapılan çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *Listeria*

#### 2.1.1. *Listeria*' ların sınıflandırılması

*Listeria*'lar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de düzgün spor oluşturmayan, Gram pozitif çomakçıklar olarak tarif edilmektedir. Bu grup içinde 7 cins (*Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia*, *Caryophanon*) yer almaktadır [Ludwig ve ark., 2009].

Taksonomik olarak önceleri *Coryneform* grup bakteriler içinde yer almış olmakla beraber, 1986 yılından bu yana *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Brochothrix* cinsleri ile beraber *Clostridium* alt dalında (subbranch) yer alır. Bu filogenetik yer DNA' daki düşük (%36-42) G+C oranı, lipoteikoik asit varlığı ve mikolik asit yokluğu ile ilişkilidir. DNA-DNA hibridizasyonu multilokus enzim analizleri ve 16S rRNA dizilişine göre *Listeria* cinsi 2 grupta 6 türe ayrılır. Bu türler; birinci grupta *Listeria monocytogenes* ve yakın ilişkili türler olan *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* (alt tür *ivanovii* ve alt tür *londoniensis*), *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* ile ikinci grupta *Listeria grayi* türleridir. Son taksonomik çalışmalara göre *Listeria murrayi* adlı tür *Listeria grayi*'ye dahil edilmiştir. Gıda mikrobiyolojisinde *Listeria ivanovii* 'nin alt türleri çoğu defa önemsenmez ve sadece *Listeria ivanovii* olarak değerlendirilir [Doğan, 2000].

#### 2.1.2. *Listeria*' ların genel özellikleri

*Listeria*, fakültatif anaerob ve mikroaerofil, basit boyamada çubuk ve kokobasil, bazen Çin alfabesi harfleri gibi görülen Gram pozitif, spor oluşturmayan psikrotrof bir bakteridir. 6 adede kadar peritrik flagellası bulunmakla beraber, bakterinin hareketliliği gelişme sıcaklığına bağlıdır. 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hareketsizdir. Kolay gelişen bakteriler içinde yer alırlar. Basit besiyerlerinde ve 3-45°C gibi geniş bir inkübasyon sıcaklık sınırında aerobik veya mikroaerofilik

koşullarda gelişebilirler. Katalaz pozitif olmalarına karşın oksidaz negatiftir [mikrobiyoloji, 2011].

*Listeria* türleri doğada çok yaygındır. Çürüyen sebzeler, toprak, su, lağım, silaj, hayvan yemi, taze dondurulmuş kanatlı etleri, taze ve işlenmiş et ürünleri, çiğ süt, özellikle yumuşak peynirler, mezbaha artıkları gibi örneklerde *Listeria*'ya rastlanabilir. Bununla beraber *Listeria*'lar toprak, çürüyen sebzeler ve böceklerden de izole edilmiştir. Dolayısıyla bitkisel ve hayvansal gıdalarda *Listeria* bulunması bir anlamda kaçınılmazdır [Orlab, 2012].

*Listeria* türleri içinde sadece *L. monocytogenes* insanlar için patojen ise de nadiren *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* de insanlarda patojenite göstermektedir. Listeriosis etmeni olan *L. monocytogenes* son yüzyılın en önemli gıda kaynaklı patojenleri arasındadır.  $\beta$ -listeriolysin adı verilen bir hemolisin üretimine bağlı olarak patojenite gösterir. Bu hemolisinin üretimi ile lipaz üretimi arasında bir ilişki olduğu ve sadece virulent suşların lipolitik olduğu gösterilmiştir. Oluşturduğu hastalığın genel klinik görüntüsü menenjit ve/veya septisemiye benzemektedir. Sağlıklı kişilerde nadiren görülür iken, doğmamış ve yeni doğmuş bebeklerde, gebelerde, özellikle bağışıklık hastalarında ve yaşlılarda ölüme kadar giden hastalıklara neden olmaktadır. Hastalığın inkübasyon süresi birkaç günden 2-3 aya kadar değişebilir. İlk kez Birinci Dünya Savaşı sırasında menenjit şikâyeti olan bir askerde belirlenmiştir. 1950'li yıllarda yılda birkaç vaka görülürken günümüzde bu sayı yılda yüzlerce vakaya ulaşmıştır. Listeriosis, halk sağlığını yakından ilgilendirir. Hastalık, diğer gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklardan farklı olarak ishal şeklinde değil menenjit, ensefalitis, septisemi ile ölü veya erken doğum gibi atipik şekillerde görülür. Sağlıklı erişkinlerde oldukça nadir ve genel nüfusa oranlandığında oldukça az vaka ile görülmekle beraber, merkezi sinir sistemine ulaştığında %20-50'ye varan ölüm oranı nedeni ile oldukça ciddi bir hastalıktır. Gebelerde hastalık grip benzeri bakteriyel hastalık şeklinde görülür. Tedavi edilmez ise fetusa ulaşır ve ölü veya erken doğumlara neden olur. Yaşlılar ve özellikle bağışıklık hastaları listeriosisden daha fazla etkilenirler. Ergin hastaların %30 kadarının bağışıklık hastası olduğu belirlenmiştir. 1985 yılında ABD ve İsviçre 'de *L. monocytogenes* bulaşmış yumuşak

peynir ürünlerinin tüketilmesine bağlı ölümlerin görülmesi bu bakteriye önem verilmesini sağlamıştır [Orlab, 2012].

*L. monocytogenes* %30 NaCl ve gıdalarda bulunmasına izin verilen düzeylerde nitrit konsantrasyonunda canlılığını sürdürebilir, pH 4,5'e kadar olan ortamlarda gelişebilir. -18°C'de dondurma ile ardışık donma ve çözündürme uygulamasında az hasar görür. Psikrotrof özelliği nedeni ile buzdolabı sıcaklığında gelişebilir. Buna karşın, düşük dozdaki radyasyon uygulamalarına duyarlıdır. Gıda korumadaki yeni eğilim olan biyoprezervatiflere duyarlıdır. Bunlardan nisin, *Pediococcus pentosaseus* ve *P. acidilactici* tarafından üretilen pediosin, *Lactobacillus bavaricus* ve *Carnobacterium piscicola* tarafından üretilen bakteriyosinlerin *L. monocytogenes* 'in gelişimini engellediği gösterilmiştir [Ekici ve ark., 2004].

Bu bakterinin spor oluşturmamasına rağmen çeşitli çevresel olumsuz koşullara uzun süre dayanabilme ve psikrotrof özellikleri nedeni ile gıdalar sadece hammadde ile değil üretim zincirinin çeşitli aşamalarında da *L. monocytogenes* ile kontamine olurlar [Orlab, 2012].

*L. monocytogenes* açısından en riskli gıdalar tüketime hazır ve soğukta uzun süre depolanmış, dolayısı ile *L. monocytogenes* 'in gelişebildiği gıdalar ile 100 kob/g 'dan fazla sayıda *L. monocytogenes* içeren gıdalardır [Gıda derneği, 2012].

1926'da *Listeria monocytogenes*'in doğada mevcudiyeti belirlendikten sonra organizmanın büyük ölçütlü yayıldığı gösterilmiş ve *L. monocytogenes* balık, sebze plantasyonları, nehir suları, pis su kaynakları, vahşi hayvanlar, böcekler ve gıdaların büyük çoğunluğu ile gıda üretim bölgelerinden izole edilmiştir. Ayrıca organizmanın sağlıklı bireylerden de %77'yi aşan oranlarda izole edildiği kaydedilmektedir [Kampelmacher ve ark., 1972].

Organizmanın süt endüstrisindeki önemi, süt ve mamülleri bazlı gıda zehirlenmelerine neden olarak sık sık karşılaşılması ve günümüzde süt ve mamüllerinin *L. monocytogenes* içermemesinin sağlanmasının bir kalite kriteri kabul

edilmesine gerek duyulmasından kaynaklanmaktadır. *L. monocytogenes*'in izolasyon ve identifikasyon yöntemleri, önemi, karşılaşılan vakalar ile ilişkili çok sayıda çalışma bulunmaktadır [Kınık ve ark., 1998].

### 2.1.3. *Listeria monocytogenes* 'in tarihçesi

Mikroorganizmaya ilk olarak 1891 yılında Alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmıştır. Daha sonra 1911'de İsveç'te tavşan ciğerinden izole edilmiş ve hastalığa 1925 yılında Almanya'da koyunlarda rastlanmıştır. Hastalık 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika bozkırlarındaki kemiricilerde Tiger River adı ile tanımlanmıştır. 1926 yılında Murray ve çalışma arkadaşları Cambridge'deki laboratuvar tavşanlarında septik bir hastalık tarif etmişler ve hastalık monositozla karakterize olduğu için etken bakteriye *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir. Daha sonra bir cerrah olan Lord Lister'in anısına *Listerella hepatolytica* ve *Listerella hominis* gibi isimler verilen organizmaya 1940 yılında Pirie tarafından *Listeria monocytogenes* adı verilmiştir. Mikroorganizmada monositoz üretici bir antijen tanımlanmasına rağmen, insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda monositoz belirleyici bir unsur değildir. Monositoz, vücuttaki kanda, normalde alyuvarların % 2-6'sını oluşturan bir hücre türü olan monositlerin sayıca artmasıdır. Bu artış pek çok hastalıkta görülen önemli bir laboratuvar bulgusudur [Farber ve Peterkin, 1991; Beumer ve Hazeleger, 2003; Beverly, 2004].

İnsanlarda listeriozis vakası ilk kez 1929'da bildirilmiş ancak Amerika ve Avrupa'daki salgınlara kadar bu hastalığın gıda kaynaklı olabileceği kanıtlanmamıştır. 1980'li yıllarda özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede bu hastalığın neden olduğu salgınlar görülmüş ve gıdalar aracılığı ile taşınan bu mikroorganizma dikkat çekmeye başlamıştır. Özellikle 1985'e kadar listeriozisin, çoğunlukla inek, koyun gibi hayvanlarla ilişkili olduğu düşünülmüş ve sadece bir meslek hastalığı (veteriner cerrah) olarak görülmüştür. Bu nedenle gıdalarda ve klinik olmayan materyallerden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için yöntem geliştirme çalışmaları büyük hız kazanmıştır. Büyük listeriozis salgınlarında enfeksiyon kaynağı olarak yumuşak peynir (Meksika tipi), çiğ lahana,



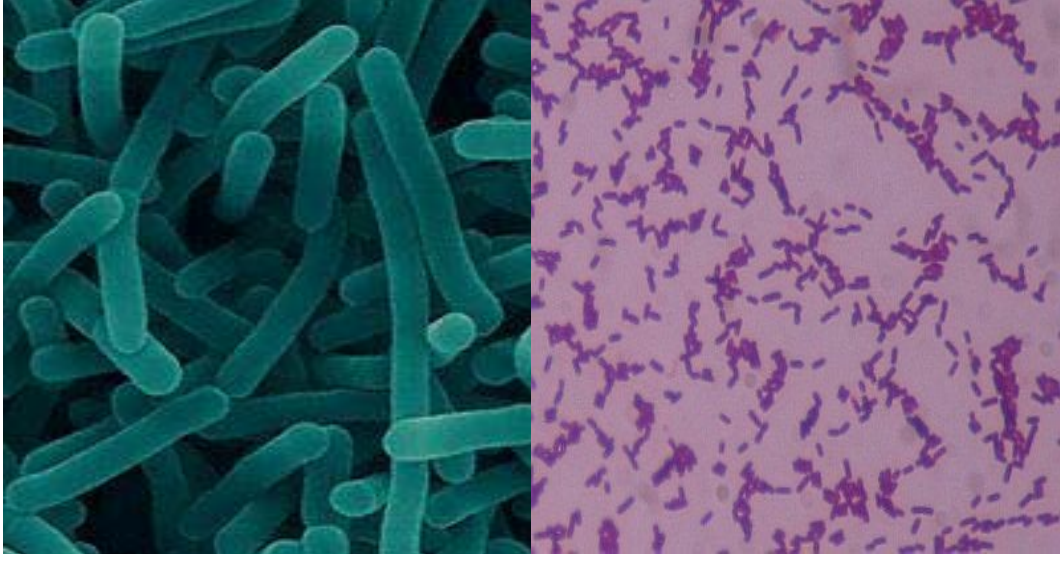
ciğer ezmesi ve jöleli domuz dili bulunmuştur [Beumer ve ark., 1997; White ve ark., 2002; McLauchlin ve ark., 2004; Reissbrodt, 2004].

#### **2.1.4. *Listeria* türlerinin koloni yapısı ve morfolojisi**

*Listeria* türü bakteriler küçük (0,5 µm çap, 1- 2 µm uzunluk ), düzgün, yuvarlak kenarlı, çomak şeklindedirler. Tek halde buldukları gibi kısa zincir veya V ve Y formunda da bulunabilirler. Gram pozitif bakteriler olup, eskimiş kültürlerde Gram boya alma özelliklerini kaybederler (Resim 2.1.). Aerob bakteriler olup, spor oluşturmazlar. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C'dir, 20-25°C'de üredikleri zaman peritrik flagellalar oluşturup hareket edebilirler, fakat 37°C'de üredikleri zaman çok az hareketli veya hareketsizdirler. Triptoz agarlı besiyerlerinde üretilen kolonileri tipik mavi-yeşil renk ve parlama gösterirler [Seeliger ve ark., 1968]. Yarı katı besiyerlerindeki stabil kültürler, mikroaerofilik özelliklerinden dolayı tipik şemsiye veya ters çam ağacı görüntüsü verirler [Kathariou ve ark., 1995].

Nutrient agarda 24-48 saatte 0,5-1,5 mm çapında düzgün kenarlı koloniler oluştururlar. Koloniler, 5-10 günlük inkubasyon süresinin sonunda 3-5 mm çapına ulaşabilirler [Rocourt, 1988]. Generasyon süresi 4 °C'de 1,2-1,7 gün, 13°C'de 7,2 saat, 35 °C'de 0,96 saattir [Doyle, 1988].

Kanlı agarda 48 saat sonra küçük gri damla benzeri koloniler beta hemoliz zonları ile çevrili olarak görülürler. Triptik soy agarda (TSA) üreyen koloniler 45°lik açı ile aydınlatıldığında mavi ile gri arası renkte görülürler. TSA'da 30°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda eskülin hidrolizinden dolayı etrafları siyah hale ile çevrilmiş grimtrak mavi koloniler görülür. İnkübasyon süresinin uzaması ile kolonilerin merkezlerinde çukurluk oluşur. *L. monocytogenes*'in optimum gelişme pH'sı nötral ya da hafif alkalidir. Seeliger ve Jones (1986) gelişme pH aralığını pH 6-9 olarak belirtmektedirler. Ancak Kampelmacher ve arkadaşları (1968) *L. monocytogenes*'in lahana sularında 5.0 pH, George ve arkadaşları (1988) ise organizmanın optimum pH koşullarının altında 4.4 pH'ya kadar düşük pH'larda gelişebildiğini belirtmektedir [Yıldız, 2005].



Resim 2.1. *L. monocytogenes*'in elektron mikroskop ve ışık mikroskop görüntüsü  
[Newspaper, 2012; Bacterio, 2012]

### 2.1.5. *Listeria monocytogenes*'in biyokimyasal özellikleri

*L. monocytogenes*'in biyokimyasal karakteristikleri ayrıntılı biçimde Gray ve Killinger ile Seeliger ve Jones tarafından incelenmiştir [Gray ve Killinger, 1966; [Seeliger ve Jones, 1986]. Gram (+) düzgün, sınırları belli kısa çubuk bakterisidir. Bazı hücreleri tek başına paralel ya da V şekilli olabilen vibriodiktir. Bazen de enfekte materyalden izole edilen organizmalar diploid formda ya da şeklinde olabilmektedir. Hücreler 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  çapında ve 0,5-2  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır, eski kültürlerinde ise filament oluşturan hücrelerin 6-20  $\mu\text{m}$  uzunluğunda olabildikleri gözlenmiştir. 25-30°C 'de geliştiği zaman organizma yalancı flagellalı yuvarlak, düz ve belirgin granüler yapıya konveks şeklindedir. Normal ışıkta kolonileri yumuşak mavi-yeşil görülmekte ancak 45°C 'de alt yüzeyden incelendiğinde (Henry Tekniği) karakteristik opak mavi, kaz yumurtası renginde görülmektedirler [Kınık ve ark., 1998].

*L.monocytogenes* glukoz, alfa metil D mannoz ve ramnozdan asit üretmektedir. Ancak ksiloz ve mannitolden asit üretemez. *L.monocytogenes*, nitratı indirgemez, koyun kırmızı kan hücreleri ile beta hemoliz gösterir, *Staphylococcus aureus* ile

pozitif CAMP reaksiyonu, *Rhodococcus* ile equi ile negatif CAMP reaksiyonu vermektedir [Kınık ve ark., 1998].

*Listeria* türleri glukoz, sorbitol, trehaloz, selobioz, amigdalin, fruktoz, mannoz, maltoz ve salisini gaz oluşturmada fermente ederler. Katalaz, Metil Red, Voges-Proskauer reaksiyonları ile eskulin ve hippurat hidrolizasyon testleri pozitif, oksidaz, üre, jelatin, kazein ve süt hidrolizasyon testleri negatiftir. Jelatini hidrolize etmezler. Ancak bu biyokimyasal özellikler, tam bir standardizasyon göstermemekte ve suşlar arasında değişiklikler görülmektedir [Rocourt, 1988; Seeliger ve Jones, 1986].

Arginin, histidin, metiyonin, ve triptofan gibi aminoasitler *Listeria* türlerinin üremesini stimüle ederler. *Listeria*'lar üremek için basta glukoz olmak üzere bazı karbonhidratlara ihtiyaç duyarlar. *L. monocytogenes* üreme sırasında karbon kaynağı olarak glukoz, ksiloz, arabinoz, ribozu kullanmamasına karşın *L. innocua*, *L. ivanovii* ve *L. Seeligeri* ksilozu fermente ederek asit oluşturmakta ve karbon kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Besiyerlerinde uygun konsantrasyonlarda bulunan demirin, *Listeria*'lar üzerinde üremeyi stimüle edici etkisi bulunmaktadır [Seeliger ve Jones, 1986].

*Listeria*'lar flagellaya sahip olduklarından hem flagellar (H) antijeni ve hem de somatik (O) antijenine göre gruplara ayrılmışlardır [Seeliger, 1988].

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' de antijenik şemada 16 serovar tanımlanmıştır [Ludwig, 2009]. Seeliger, Jones ve Rocourt'a göre *L. grayi* ve *L. murrayi*'nin serolojik açıdan *Listeria* cinsinden farklı olarak kendi aralarında birbirleri ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [Seeliger, 1988].

Yapılan araştırmalarda *Listeria*'larda plazmid varlığı da saptanmıştır. Kolstad ve arkadaşları (1990) tavuk eti, peynir, sosis ve insanlardan yaptıkları çalışmada 139 *Listeria* spp. izole etmişler; 107 suşta ekstrakromozomal DNA ve 51 adet plazmid izole etmişlerdir [Kolstad ve ark., 1990].

*Listeria* spp. için litik özellik gösteren fajlar göz önünde bulundurularak faj tiplendirme sistemi geliştirilmiştir. *Listeria* spp. “listeriozin veya monosin” adlı maddeler salgılayabilirler. Monosin kolisin benzeri olup antibiyotik etkilidir ve tripsine dayanıklıdır. *Listeria*’lar Gram (+) mikroorganizmalarda bulunan Ranz Antijenine de sahiptirler ve bir çok mikroorganizma ile antijenik ilişkileri nedeni ile çarpaz reaksiyonlar şekillenmektedir [Mc Laughlin ve ark., 1986].

### 2.1.6. *Listeria monocytogenes*’in gelişmesi ve canlılığını sürdürmesi

*Listeria monocytogenes*’in oldukça yüksek sıcaklıklara dirençli olduğu, ayrıca buzdolabı sıcaklıklarında da çoğalabildiği ve nemli ortamlarda birkaç ay, tuzlu ve kuru ortamlarda ise iki yıla yakın yaşayabildiği bilinmektedir. *Listeria* birçok proste ısı işlemlerle imha edilmekte, ancak karşılaşılan ısıya karşı dirençliliği *Listeria*’nın türüne ve gıdanın yapısına göre değişiklik gösterebildiği çalışmalarla kanıtlanmıştır [Sergelidis ve Abraham, 2009; Huang, 2009].

*L. monocytogenes*’in süt için uygulanan pastörizasyon işlemine dayanma yeteneğiyle ilgili çelişkili bilgiler mevcuttur. Donnelly ve arkadaşlarının (1988) sütlerle ilgili yaptıkları bir çalışmada 61,7 °C’de 35 dakikalık pastörizasyon sonunda organizmanın  $5 \times 10^3$  kob/mL düzeyinde canlı kalabildiği görülmüştür. Bu nedenle peynir yapılacak çiğ süte uygulanacak pastörizasyon işleminde sıcaklığın 72°C’nin altına düşürülmemesi önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 71,7°C’de 15 saniye süre ile yapılan pastörizasyonun, çiğ sütlerdeki *L. monocytogenes* düzeyinin insan sağlığı açısından risk oluşturmayacak bir düzeye indirdiğini bildirmesine rağmen çok nadir olarak bu bakterinin canlı kalabildiği belirlenmiştir. Bu sorun 1983’lerde ABD’de pastörize süt tüketimine bağlı olarak meydana gelen büyük bir listeriozis salgınında ortaya çıkarılmıştır. Buna rağmen bu salgında yer alan *L. monocytogenes* suşunun doğrudan pastörizasyon uygulamasında canlılığını sürdüremediği net bir biçimde gösterilmiştir [Lovett ve ark., 1990]. İngiltere’de incelenen 1000’den fazla pastörize süt örneklerinin %1’inde *L. monocytogenes* varlığının pastörizasyon sonrası kontaminasyon veya yetersiz işlemi gösterdiği vurgulanmaktadır [Greenwood ve ark., 1991]. Meksika tipi yumuşak peynirler,

ABD’de 18 yetişkin ve 29 doğmamış bebeğin ölümüne de neden olarak bildirilen 103 vakanın nedeni olan görülmüştür. Kesin neden hakkında bazı şüpheler olmakla birlikte pastörizasyon sonrası kontaminasyona bağlı olduğu düşünülmektedir [Dirksen ve Flagg, 1988].

Japonya’da yapılan bir çalışmada peynir üretim alanlarından toplanan 19 peynir örneğinin 15’inde ve 64 peynir örneğinin 11’inde *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiştir. Bu olay, listeriozisin süt ürünlerinde kaçınılmaz ortak bir sorun olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, pastörize edilmiş veya edilmemiş süttten yapılan özellikle de yumuşak peynirler listeriozis vakalarına neden olan süt ürünlerine dahil edilmektedir [Makino ve ark., 2005].

Vacherin Mont-d’Or olarak tanınan İsveç peynirinden kaynaklanan listeriozis salgınıyla ilgili de 31 ölüm bildirilmektedir [Bannister, 1987; Antognoli ve ark., 2009; Harakeh ve ark., 2009].

*Listeria* türlerinin 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 saptanmıştır [Cotter ve ark., 2000; McLauchlin ve ark., 2004].

Ekstrem sıcaklıklar, pH değerleri, ozmotik basınç, besin azalması, toksik veya inhibitörlerin varlığı, antibiyotikler, bakteriyostatik veya bakterisidaller, *L. monocytogenes*’in gelişim oranını azaltan etkiler olarak ifade edilebilir [Archer, 1996; Hof ve ark., 1997; Walsh ve ark., 2001; Prazak ve ark., 2002; Chen ve ark., 2009].

*L. monocytogenes*’in vakum altında ve modifiye atmosferdeki gelişimi incelenmiş; vakumlu ortamın ve modifiye atmosferdeki %40 oranında bulunan CO<sub>2</sub>’in gelişmeyi etkilemediği, hatta %70 oranındaki CO<sub>2</sub>’in de, ortamda %5 oksijen bulunması halinde gelişmeyi inhibe etmediği gösterilmiştir [Tunail, 2000].

Hindi eti ürünlerinde sodyum diasetat; pişmiş sığır etinde, karaciğer ve Bologna tipi sosislerde sodyum laktat; dilimlenmiş sığır eti dokularında trisodyum fosfat; kerevit (tatlı su istakozu) kuyruğu eti homojenatında monolaurin ve laktik asit gibi bileşikler, *L.monocytogenes*'e karşı antilisterial etkili bulunmuştur [Schlyter ve ark., 1993; Dickson, 1994; Miller ve Acuff, 1994; Qvist ve ark., 1994; Shelef ve Potluri, 1995; Patel ve ark., 2009].

Tavuk etinden yapılmış burger örnekleriyle yapılan bir çalışmada, bu örneklerde sodyum laktat ilavesinin antilisterial etkisi olduğu ve %2,5 sodyum laktat eklenmesinin *L.monocytogenes* gelişimini tamamen engellediği gözlemlenmiştir [Cubina ve Mascort, 1999].

Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinlerin, *L. monocytogenes*'in gelişimini engellediği bildirilmektedir [Patel ve ark., 2009]. Yapılan bir çalışmada başlangıç *L. monocytogenes* sayısı 4,4 log kob/ mL olan sütte 125 IU nisin kullanımının 6 saat gibi kısa bir sürede patojen sayısında 4 log birimlik bir düşüşe neden olduğu ve bu süre sonunda 0,4 log kob/mL *L. monocytogenes* bulunduğu tespit edilmiştir [Bhatti ve ark., 2004].

### **2.1.7. *Listeria monocytogenes*'in patojenitesi**

*Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarının oluşumunda şu faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir:

- *L. monocytogenes* sıcak kanlı konakçılar dışında, çevrede hatta buzdolabı ısısında yaşama ve gelişme kabiliyetine sahiptir.
- *L. monocytogenes*'in insan ve hayvanlara bulaşması primer olarak gıdalardan kaynaklanır.
- Gıdalardan kaynaklanan Listeriozis, ilgili gıdanın alınması ile olur. Çevreden enfeksiyonun alınması yaygın bir yol değildir.
- Patojenik türler ayrı salgınlara neden olurlar [Yıldız, 2005].

Gray ve Killinger, *L. monocytogenes* ile ilgili hastalık belirtilerini aşağıdaki şekilde sıralamaktadırlar:

- Meningo ensaphilitis (merkezi sinir sistemi ve beyin enfekte olduğunda) bu daha çok yeni doğmuş bebeklerde ve 40 yaşın üzerindeki yetişkinlerde yaygındır.
- Prematüre bebeklerde septisemi
- Erken doğumlarda grip benzeri septisemi
- Mononukleosis enfeksiyonları
- Yetişkinlerde septisemi: Bunun yanında orta kulak iltihabı, farenjit, sinuzit, bademcik iltihabı görülür.
- Akciğer iltihabı
- Endokarditis
- Bölgesel iltihaplar (iç ve dış dokularda)
- Deri dokusunda normal ya da abseli sivilceler
- Konjonktivit
- Yalancı hamilelik ve yavru atma
- Hafıza kayıpları
- Yetişkinlerde sinir krizi (Kınık ve ark., 1998).

*Listeria monocytogenes* ile enfekte olan hastalarda görülebilen enfeksiyonlar aşağıdadır:

*Soğuk algınlığı benzeri hastalık:* Bu tablo listeriosis esnasında görülür. Hafif ve iyi huylu bir hastalıktır, kısa sürer ve kendiliğinden iyileşilir.

*Aseptomatik taşıyıcılık:* En çok görülen tablodur. En fazla bir ay kadar sürer. Bakterinin çevreye salınımı dışkı ile olmaktadır.

*Septikoanjinöz listeriaz:* İnfeksiyöz mononükleosise benzer. Bazen konjunktivitle birlikte. Boyun ve çenealtı lenf bezleri şişer.

*Menenjit ve menengoensefalit:* Bu hastalıklar aynen sepsis gibi yenidoğanlarda yaşamın 3-5. gününden sonra ve bağışıklık sistemi olan 40 yaşın üstü erişkinlerde görülür. Ancak bağışıklık sistemi tamamen normal olan genç ve yetişkinlerde de görülebilmektedir. BOS'tan *L. monocytogenes* izole edilebilir.

*L. monocytogenes*'in yaptığı menenjit *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis*'in yaptığı menenjitten oldukça farklıdır.

*L. monocytogenes*'in yaptığı menenjitte hem serebritis hem de beyin absesi birlikte bulunmaktadır. Bu tip menenjit koyunlarda görülen Circling Disease'e çok benzer ve insanlarda rhomboensefalit olarak adlandırılmaktadır. Rhombosefalit ateş, kusma, mide bulantısı ve baş ağrısı ile 3-5 günde kendini belli eder. Hastaların %30 kadarında başlangıç septomu olarak koma görülür. Daha sonra bilinç kaybı, his kaybı görülebilir. %50'ye yakın hastada solunum yetmezliği görülür.

*Septisemik Listeriosis:* Sıklıkla yenidoğanda ve gebelerde görülür. 40°C'ye çıkan yüksek ateş bronkopnömoni ve menenjit tablosu eklenebilir. Yeni doğanlarda hastalık doğumdan 3-5 gün, 1 ay sonra açığa çıkar. Erişkinlerde ise genellikle 40 yaşın üstündeki immünsupres hastalarda görülür.

*Granulomatosis infantiseptica :* Fetus, yenidoğan ve süt çocuklarında görülen önemli klinik formlardan biridir. İntrauterin-plasenter geçişle abortus veya ölü doğumlara neden olur. Mekonyum, safra, organlar, anne idrarında *L. monocytogenes* saptanabilir. Vücut ısısında düşüklük, nefes darlığı, morarma, kusma ve gözde döküntüler rastlanır.

*Düşük:* Hamilelikte hücresel immünite oldukça yetersizdir, bu da hamile kadınları Listerial hastalıklar için risk altına sokar. Hastalık hamileliğin herhangi bir safhasında görülebilir. Hamilelikte Listeriosis merkezi sinir sisteminde çok fazla gözlenmez. Hastalık genelde bakteriyemi ile başlar, 39°C'in üstünde ateş, başağrısı, adeste/kas ağrısı, eklem ağrısı, halsizlik gözlenir. Bacteriyemi kanla yayılır ve plesanta yolu ile bebeğe geçer. *L. monocytogenes* ile enfekte olmuş hamilelerin



%90'nında bakteri fetusuda etkiler. Vakaların %22'sinde ölü doğum gözlenir. Hamile kadınlarda Listeriosis sırasında tedavi olarak antibiyotik verilmesi ölüm oranını düşürmektedir. Düşük yapan kadınların serviks, vajinal akıntı ve plasentasından *L.monocytogenes* izole edilebilir.

*Deride papüler veya püstüler lezyon yapan listeriosis:* Genellikle meslek hastalığı şeklinde ortaya çıkar. Bu klinik form özellikle veterinerler, mezbaha işçileri ve benzer çalışanlarda görülür. Lenf bezleri şişer, ateş, baş ağrısı olur.

*Fokal Listeriosis:* *L. monocytogenes* kontakt yoldan alınırsa göz ve deride lokal infeksiyonlar olur. Bu tip hastalıklara genellikle veterinerlerde daha çok rastlanır. Ayrıca peritonit, hepatit, plörotit, dalak abseleri, perikardit, ostiyomyelit gibi rahatsızlıklara da neden olmaktadır. Bu rahatsızlıklar Listerial endokardit ile septik emboli sonucu oluşan, genellikle immünsupres hastalarda daha sık görülen rahatsızlıklardır [Serter ve ark., 2000].

Yapılan çalışmalar kanserli hastaların da *L. monocytogenes* ile enfekte olma oranlarının oldukça fazla olduğunu göstermektedir [Coşkun, 2006].

Hayvanlarda ise hastalık aşağıdaki yollarla etkili olmaktadır:

- ✓ Hamile hayvanlarda uterusun enfeksiyonunu izleyen yavru atma, ölü doğum ya da doğumdan sonra ilk dört haftadan kaydedilen ölümler. Bu çoğunlukla sığır ve koyunları etkilemektedir.
- ✓ Viseral ya da septisemi enfeksiyonlarından sığırlar etkilenebilmesine karşın bu çoğunlukla yeni doğmuş kuzularda da görülmektedir.
- ✓ Ruminantlarda (geviş getirenlerde) ensephalitis: Bu hastalığın en yaygın şekilde görülen belirtisidir ve koyun, sığır, keçileri etkilemektedir. Organizma hayvanların beynini etkilemekte, felç ve yürüme bozukluklarına yol açmaktadır.
- ✓ Sığır mastitisi: *L. monocytogenes*'in bu etkisi çevresel koşullarda bulunduğu tahmin edilen düzeye göre daha az yaygındır. Ancak bir kez kronik *L.monocytogenes*

mastitisi tespit edilmiştir ve organizma süt ineğinin yaşamının devamında ya da tam anlamıyla tedavi edilinceye dek süte salgılanabilmektedir [Kınık ve ark., 1998].

Önemli patojenlerden biri olan *L. monocytogenes* toprakta, suda, kötü kaliteli silajlarda yaygın olmasından dolayı buradan hayvanlara ve hayvanların dışkıları ile tekrar çevreye bulaşmakta ve sonuçta iyi bir sanitasyonun uygulanmadığı durumlarda gıda maddelerinin üretimi, taşınması ve tüketimi sırasında ürünler kontamine olmaktadır [Öksüztepe ve ark., 2011].

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar *Listeria monocytogenes*'in önemli halk sağlığı sorunlarına neden olduğunu ve bu sorunlarda *L. monocytogenes* ile kontamine olan gıdaların büyük rol oynadığını ortaya koymaktadır [Önder, 2003].

Son yıllarda Listeriozis vakalarında önemli bir artış söz konusudur. Danimarka'da her yıl bir milyon insanda 2-3 Listeriozis olgusu rapor edilmektedir. Danimarka'da 1981-1986 yılları arasında 85 Listeriozis olayı bildirilmiş ve bunların 33'ünün *L. monocytogenes*'e bağlı menenjit'e neden olduğu belirtilmiştir [Bahk ve Marth, 1990]. Yine Amerika'da her yıl 2000 vaka ve 450 ölüm olayının Listeriozisten ileri geldiği bildirilmekte ve bu da bir milyon insan için Listeriozis'e yakalanma oranının %0,8 olduğunu göstermektedir [Schuchat ve ark., 1992].

Benzer olaylara diğer Avrupa ülkelerinde de rastlanmıştır. Örneğin Fransa'da 1984 yılında 125, 1985'de 215 Listeriozis olayı saptanmış ve bunların 107'sinin fetal kaynaklı olduğu belirtilmiştir [Yıldız, 2005].

#### **2.1.8. Klinik önemi**

Gebe olmayan erişkinlerde *L. monocytogenes* özellikle menenjit, ensefalit veya septisemiye yol açar. Yaşlılar ya da hücrel immünitenin zayıfladığı organ nakli, lenfoma ve insan immün yetmezlik virüs (HIV) enfeksiyonu gibi predispozan koşulları bulunan kişiler özellikle duyarlıdır. Bazı nadir durumlarda ise hastaların bilinen predispozan faktörleri bulunmamaktadır. *Listeria monocytogenes*'in santral

sinir sistemine tropizmi sıklıkla yüksek mortalite (%20-50) ile seyreden ya da hayatta kalanlarda nörolojik sekel bırakan şiddetli hastalıklara yol açar. Gebelerde *L. monocytogenes* sıklıkla grip benzeri bakteriyemik hastalığa ve eğer tedavi edilmezse plasentayı geçebildiği için plasentit ve amniyonit ve fetus enfeksiyonu ile abortus, ölü doğum veya erken doğuma yol açabilir. Bazı vakalarda annenin kan kültüründe *L. monocytogenes* saptanması ile erken tanı konabilir. Doğumda tanı, mikroorganizmanın yeni doğana ait beyin-omurilik sıvısı (BOS), kan, amniyon sıvısı, solunum sıvıları, plasenta ve deri sürüntü örnekleri, mide içeriği ya da mekonyumda saptanması ile konabilir. Bu örneklerin direkt mikroskopik incelemesinde gram pozitif basillerin görülmesi hastalığın erken tanısında yararlı olabilmektedir [Bille, 2009].

Fetal enfeksiyonlar, bir bakteriyemi atağından sonra nadiren ortaya çıkabilir. Bununla birlikte, veterinerler ya da mezbaha işçileri arasında enfekte hayvan dokularından direkt temas ile bulaşan, bakteriyeminin eşlik ettiği ya da etmediği primer deri listeriyozu bildirilmiştir. Endokardit, artrit, osteomyelit, karın içi apse, endoftalmit ve plöropulmoner enfeksiyonlar nadir olarak rapor edilmiştir [Bille, 2009].

İnkübasyon dönemi ve enfektif doz tam olarak belirlenmemiştir. Bildirilen inkübasyon süreleri birkaç günden 2-3 aya kadar değişiklik göstermektedir. Sistemik listeriyozlu bazı kişilerde diyare gibi gastrointestinal sistem belirtileri gözlenmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda geçici sağlıklı taşıyıcılık %2-20 oranındadır. Geçen on yılda *L. monocytogenes*'in etken olduğu febril gastroenterit salgınları bildirilmiştir. İlişkili olduğu saptanan yiyecekler; çikotalı süt, pirinç salatası, mısır ve ton balığı salatası, tütülenmiş soğuk alabalık, salamura et ve jambon, şarküteri ürünleri ve peynirdir. Gastroenterit salgınları bazı yönlerden invazif enfeksiyonlardan farklılık gösterir ve listeriyoz için bilinen predispozan faktörleri bulunmayan kişileri etkiler. Hastalık tipik olarak büyük yoğunluktaki bakterinin ( $1,9 \times 10^5$  -  $1 \times 10^9$  CFU /gr ya da ml) alımından 24 saat sonra görülür ve genellikle 2 gün sürer. En sık rastlanan belirtiler ateş, sulu diyare, bulantı, baş ağrısı, kemik ve eklem ağrısıdır. Rutin enterik patojenlerin araştırılarak dışlandığı gastroenteritlerde etkenin *Listeria monocytogenes*

olabileceği dikkate alınmalıdır. Kadınlarda servikovajinal taşıyıcılık yok gibi görünmektedir [Bille, 2009].

Listeriyoz başlıca sanayileşmiş ülkelerde gözlenir. Sporadik ve endemik olarak görülebilir. İki bulaş şeklinde de asıl yol kontamine gıdalardır. Az sayıda , sınırlı , yiyeceklerle ilişkisi olmayan, çoğunlukla çocuk odalarında görülen hastane kökenli salgınlar bildirilmiştir. Çapraz enfeksiyona yol açan bu salgınların birinde banyo için kullanılan mineral yağ kontaminasyonu sorumlu bulunmuştur. Tipik sporadik listeriyoz olgu sayısı 100 000 kişide 0,5-0,8 olarak bildirilmektedir. Gıda kaynaklı salgınlarda insidans 100 000 kişide 5 olguya yükselebilmektedir. Hastalığı bulaştırmada aracı olan, buzdolabı ısısında saklanan hazır gıdalar içinde *Listeria* üremesini sürdürebilmektedir. Bu gıdalar arasında lahana, taze peynir, ezme, kümes hayvanları, hindi sosisi, mantar, süt, jölede, domuz dili ve tütülenmiş balık balık bulunmaktadır. Yiyeceklerde kantitatif testler ile çok sayıda ( $10^3$  CFU/gr) mikroorganizma saptanabilmektedir [Bille, 2009].

*Listeria* patogenezinin anlaşılmasında son zamanlarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Kontamine gıdanın alınmasından sonra invaziv enfeksiyonun bazı kişilerde gelişimi birkaç faktöre bağlıdır. Bunlar arasında konağın duyarlılığı , mide asiditesi, alınan bakteri yoğunluğu, mikroorganizmanın virulans faktörleri ve yiyecek tipi yer almaktadır. *Listeria monocytogenes* intestinal sistemin epitelyal bariyerini geçtikten sonra bir takım virulans faktörleri sayesinde karaciğer ve dalak makrofajları içinde üreyebilir. Daha sonra asıl virülans faktörü olan internalin ile bir plasental reseptör olan E-kadherin ile etkileşiminden dolayı santral sinir sistemine ya da gebelerde uterusu yayılır. Listeriyoza karşı immün cevapta başlıca makrofajlardan salınan lenfokinler ile T-hücre aracılıklı aktivasyon rol oynamaktadır [Bille, 2009].

### **2.1.9. *Listeria monocytogenes* 'in antibiyotik duyarlılığı**

*Listeria monocytogenes* türü birçok antibiyotiğe karşı değişik derecelerde duyarlılık göstermektedir. Agar disk difüzyon yöntemine göre in vitro olarak *Listeria* izolatlarının Ampisilin, Karbenisilin, Sefaloridin, Kloramfenikol, Eritromisin,

Furazolidon, Neomisin, Novobiosin, Oleandomisin, Tikasilin, Azlosilin'e duyarlı; Klortetrasiklin, Tetrasiklin, Oksitetrasiklin, Gentamisin, Kanamisin, Penisilin-G ve Streptomisin'e az duyarlı olmalarına kasın Kolitsin, Sulfat, Nalidiksik asit, Polimiksin-B ve Sulfonamidler'e dirençli olduğu bildirilmiştir [Topcu, 2006].

### 2.1.10. Sütlerde *Listeria monocytogenes*

*Listeria* türü mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonların birçoğu süt ile taşınmaktadır. Süt *Listeria* bakterilerini mide asitinin etkilerinden koruduğu için bu hastalığın bulaşmasında ve yayılmasında oldukça özel bir etkisi vardır [Gönülalan, 2010].

*Listeria* türleri sütü üç yolla kontamine edebilirler. Birinci olasılık bakterinin süt ile çıkarılmasıdır. Bu *L. monocytogenes*, *Brucella* ve *Mycobacterium* gibi bütün fakültatif hücre içi bakterilerin ortak özelliğidir. Bu özellikteki bakteriler lökositlerin içinde çoğalabilir ve yine bu hücrelerle birlikte süttten salgılanabilirler. İkinci olasılık olarak kontaminasyon meme üzerindeki lezyonlardan kaynaklanabilir ve genellikle sağımçıların elleriyle bulaşır. Buna benzer bulaşma *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Corynebacteria*' larda da meydana gelebilir. Üçüncü olasılık ise kontaminasyonun süt sağıldıktan sonra meydana gelmesidir. Bu tarz bulaşma *Salmonella*' ların süte bulaşmasında görülmektedir. Sütlerin kontaminasyonunun olası diğer bir kaynağı da dışkıdır [Gönülalan, 2010].

*L. monocytogenes* sütte serbest olarak veya süt içinde yaygın olarak bulunan lökositlerin içinde bulunur. İnsan ve ineklerin sütleri, özellikle de kolostrumları yoğun monosit ihtiva etmektedir ve süt içerisinde bulunabilen bakterilerin hemen hepsi fakültatif intraselüler mikroorganizmalardır. *Listeria* bakterisinin intraselüler olması bu bakteriyi sütte bulunan immünoglobulin, lizozim, peroksidaz ve laktoferin gibi birçok antiinfektif substansa karşı koruyabilir. Ayrıca yine bu özelliğinden dolayı yetersiz pastörizasyon işleminde de canlı kalabilir, buzdolabı ısısında üreyebilir ve gıdalarla birlikte alınabilirler [Gönülalan, 2010].

Birçok çalışmada *Listeria* türlerinin sütte kış aylarında yaz aylarına göre daha çok izole edildiği görülmüştür. Bunun sebebi olarak kış aylarında hayvanların daha çok silajla beslenmesi, uzun süre kapalı mekanlarda tutulmaları, aynı zamanlarda rastlayan hastalıklar gibi kış aylarında *Listeria* türü bakterilerin insidensinin artmasına neden olan faktörler olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmalarda ise çiğ sütte *Listeria* türlerinin izolasyonunun kış aylarında daha düşük olduğu, diğer birkaç araştırmada ise etkenin izolasyonunda mevsimsel bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir [Gönülalan, 2010].

Listerial mastitisli ve klinik olarak normal görünüşlü ineklerin sütleriyle *L. monocytogenes* çıkardıkları bildirilmektedir. Az sayıda çalışmada ise listerial mastitisli ineklerin sütleriyle her mililitrede yaklaşık 103 *L. monocytogenes* saçıkları rapor edilmektedir. Listerial meningitisli ve listerial abortus yapan süt sığırları sütleriyle yıllarca *L. monocytogenes* çıkardıkları bildirilmiştir. Silajla beslenen hayvanların sütleriyle diğer yemlerle beslenen hayvanlardan daha fazla oranda bakteriyi çıkardıkları tespit edilmiştir [Gönülalan, 2010].

Ülkemizde ve dünyada çiğ sütlerde *Listeria* türlerinin varlığını araştırmak amacıyla yapılan birçok çalışmada değişik oranlarda patojen ve apatojen türler izole edilmiştir [Gönülalan, 2010].

## **2.2. Biyofilm**

### **2.2.1. Biyofilmin tarihçesi**

Biyofilm kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek' un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları tespit etmesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978' den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır [Costerton ve ark., 1978]. O zamandan beri biyofilm yapısı, oluşum nedeni ve mekanizması ile ilgili çalışmalar hızla ilerlemiş olup biyofilmlerin varlığı derin

yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır [Costerton ve ark., 2005].

İlk defa Zobell tarafından kullanılan slide teknikleri 1943 yılında araştırmacı tarafından biyofilmler hakkında ilk yayının da yapılmasından sonra [Zobell, 1943], 70'lerin sonunda bu fenomenin tüm doğal alanlarda evrensel olarak var olduğu fark edilmiştir. Marshall 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir [Marshall, 1976]. 1978 yılında ise Costerton ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarid içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adhezyona aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir [Costerton ve ark., 1978]. Yine aynı araştırmacı 1987 yılında biyofilmin daha çok aniyonik ekzopolimer matriksden oluşan oldukça hidrate yapı içinde sesil hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu bildirmiştir [Costerton ve ark., 1987]. Costerton ve Lappin-Scott, 1995' e gelindiğinde bakterilerin biyofilm oluşturmasının ve adhezyonunun bir kısım spesifik genler tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir [Costerton ve Lappin-Scott, 1995].

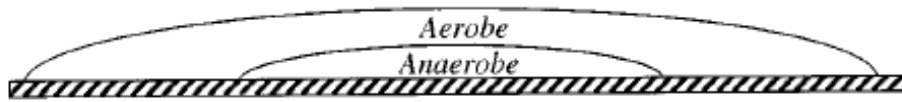
### **2.2.2. Biyofilmin tanımı ve önemi**

Biyofilm tabakası “canlı veya cansız bir yüzeye yapışık olarak kendi ürettikleri polimerik matriks içinde yaşayan bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluk”, “yoğun bir ekzopolimer matriks içinde, mikroorganizmalar tarafından organize olmuş fonksiyonel ortaklık” ya da “bir yüzeye tutunmuş organik polimer matrikse gömülü mikrobiyal birlik” olarak değişik tarzlarda tanımlanmıştır [Dunne, 2002].

Biyofilmin temel birimi “mikrokoloniler” dir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türden bakteri hücresinden oluşurlar. Mikrokolonilerin %10-25' i hücrelerden, %75-90' ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler çoğunlukla “mantar benzeri şekil” e sahip yapı olarak tanımlanırlar [Daştan, 2006].

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücrenel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir [Donlan, 2002].

Biyofilm büyüdüğüde, polimer matriks içerisinde enkapsüle edilen mikroorganizma sayısı artar. Biyofilm yapısının şekillenmesinde, difüzyon baskın faktör haline gelir. İç tarafta kalan mikroorganizmalar oksijen, besin ve üreme ortamı açısından yüzeydekilere nazaran dezavantajlı konumdadırlar (Şekil 2.1). Bu nedenle film yapısında başlangıçta aerobik mikroorganizmalar çoğunlukta iken, aerobik mikroorganizmaların sayıca artış göstermeleri sonucunda ortamdaki oksijen miktarı hızlı bir biçimde düşer ve oksijen noksanlığında anoksik bölge oluşumu gerçekleşir [Costerton ve ark., 1999].



Şekil 2.1. Biyofilmdeki oksijen dağılımı [Costerton ve ark., 1999].

Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur [Davey ve ark., 2000]. Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler [Donlan ve Costerton, 2002].

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstrasellüler içeriğini oluşturur. İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif



bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir [Çiftçi, 2005].

Sonuç olarak Donlan ve Costerton biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve elde edilen bilgiler ışığında biyofilmleri;

- Hücreleri geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüzey veya birbirlerine tutunmuş olan,
- Kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülmüş,
- Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıkları olan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır [Donlan ve Costerton, 2002].

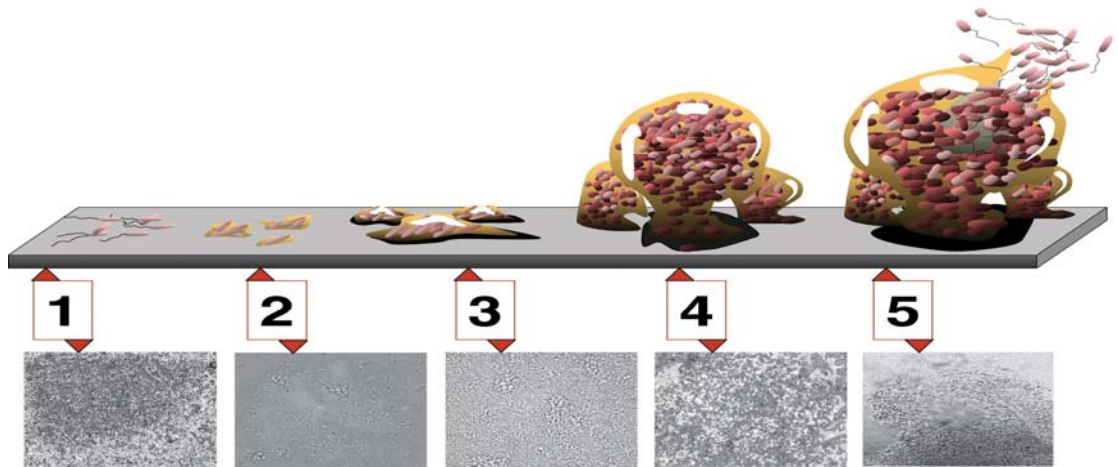
Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerinde zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir. Mikroorganizmaların serbest formdan biyofilme geçişlerinin dört temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Birinci neden, mikroorganizmaların kendilerine daha korunaklı bir ortam yaratma gereksinimidir ve bu durum “koruma” olarak tanımlanmaktadır. İkinci neden; mikroorganizmalar kendilerine besin miktarı bakımından bol bir çevre oluşturmaktadırlar ve bu da “kolonizasyon” olarak tanımlanmaktadır. Üçüncü olarak mikroorganizmalar ortak yaşamın yararlarından faydalanmaktadırlar ve bu “birliktelik (symbiosis)” olarak tanımlanmıştır. Dördüncü olarak ise mikroorganizmalar biyofilm şeklinde üremektedirler, serbest koloniler belirli bir değerden sonra üreme sürecini durdurmaktadırlar [Jefferson, 2004].

### 2.2.3. Biyofilm oluşum mekanizması

Doğada ve gıda sistemlerinde mikroorganizmalar yaşama yeteneği ve gelişimi için elverişli besinlerle uygun hale gelmiş katı yüzeylere ilgi duyarlar. Mikroorganizmalar başlangıçta katı yüzey üzerine çöker daha sonra yapışır, gelişir ve hücre kolonilerinin oluşumu aktif olarak artar. Bu bakımdan mikroorganizmaların tam kolonizasyonuna yardımcı organik polimerlerin oluşumu esastır [Allison ve Sutherland, 1987].

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir. Biyofilm oluşumu rastgele bir süreç değildir. Bakteri bir yüzey ile karşılaştığında, genetik olarak belirlenmiş bir seri süreç birbirini izler. Bunlar sırasıyla şöyledir (Şekil 2.2.):

- 1- Bakterinin yüzeye reversibl yapışması.
- 2- Bakterinin ekzopolimerik yapılarla yüzeye irreversibl olarak yapışıp, hareket için gerekli oluşumlarını kaybetmesi.
- 3- Biyofilmin ilk oluşma dönemi.
- 4- Biyofilmin tamamen olgunlaşarak kompleks yapıyı oluşturduğu dönem
- 5- Oluşan mikrokolonilerden hareketli bakterilerin ortama dağılımı [Marshall, 1976].



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum mekanizması [Marshall ve ark., 1976].

## Biyofilm oluşumu:

### *Mikrobiyal yapışmanın mekanizması*

Biyofilm gelişimi uygun mikroorganizmaların varlığında hemen hemen her çevre ve her yüzeyde meydana gelebilir. Mikroorganizmaların çoğunluğu durumunda; mikroorganizmaların normal yaşamaları ve üremeleri için katı yüzeylere tutunmasında canlı ya da inert ve/veya organik ya da inorganik oluşumlar esansiyel şartlardır [Costerton ve ark., 1987; Melo ve ark., 1992, Zottola ve Sasahara, 1994].

### *Yüzey koşullandırması*

Biyofilm oluşumu bakterinin var olduğu neredeyse her yüzeyde ve çevrede meydana gelir. Gıda işletim sisteminde et ve süttten protein gibi organik ve inorganik moleküllerle birlikte bakteri yüzeye tutunarak biyofilm oluşturur. Bu organik ve inorganik moleküller, ve mikroorganizmalar sıvı akış dalgası ve diffüzyonla yüzeye aktarılır. Aktarımın oranı ve yüzeye tutunmanın boyutu bu bağlamda aynı derecede önemlidir [Characklis, 1981]. Gıdyla temas eden yüzeyler üzerindeki sıvı-katı ara yüzeyindeki moleküllerin akümülyasyonu sıvı faza nazaran besinlerin daha yüksek konsantrasyonuna neden olur. Gıda işletim sistemlerinde gıda ile temas eden yüzeylerdeki gıda kalıntılarının seviyesinin artması biyofilm oluşumunda rol oynar [Hood ve Zottola, 1997]. Ayrıca besin transferi biyofilmde sıvı fazdaki bakteri hücrelerinde daha hızlıdır. Besin seviyesindeki artış biyofilm oluşumunu destekler ve ayrıca biyofilmle ilişkili rekabetçe kültür tipine de bağlıdır. Şartlar ayrıca vizkozite, serbest yüzey enerjisi elektrostatik ve hidrofobisitedeki değişiklikler gibi mikrobiyal olayların sonraki sekansına etki edebilen fizikokimyasal özelliklerdede başkalaşabilir [Dickson ve Koohmaraie, 1989]. Taramalı elektron mikroskobu göstermiştir ki gıda kökenli patojenler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar tipik olarak gıda işletim çevrelerinde bulunan paslanmaz çelik alüminyum, cam, Buna-N, teflon ve naylon materyaller üzerinde biyofilm olarak birikmektedir [Herald ve Zottola, 1988; Mafu ve ark., 1990; Notermans ve ark., 1991]. Naylon ve teflon yüzeyler pürüzsüzdür ve mikroorganizmalar yapışmaya hazır durumdadırlar. Bununla birlikte

alüminyum yüzeyler daha geniş yarıklara ve sünger bez görünümüne sahipken paslanmaz çelik yüzey bakterileri tuzağına düşürmek için elverişli olan çatlak ve yarıklardan dolayı pürüzlü bir görünüme sahiptir [Wirtanen ve ark., 1996].

### *Hücrelerin tutunması*

Biyofilm oluşumundaki ikinci aşama mikroorganizmaların şartlanmış yüzeye tutunmasıdır. Bu aşama aktif ya da pasif olabilir ve bakterinin hareketliliğine ya da planktonik hücrelerin transportuna bağlıdır. Bakteri hücre yüzeyinin fiziko-kimyasal özelliği başlangıçtaki yapışma fazı sırasında hücrelerin tutunmasının belirlenmesinde önemlidir [Van Loosdrecht ve ark., 1990]. Bakteriyel tutunma bakterilerin gelişme aşaması ve ortamdaki uygun besinlerden de etkilenir. Hücresel tutunma reversibl aşamayı takip eden irreversibl aşama olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Başlangıçta bakteri hücreleri arasında gelişen zayıf etkileşim ve substrat reversibl tutunmadır. Reversible yapışma sürecine etkileyen çeşitli uzun mesafe etkileşim güçleri, van der Waals çekim güçleri, elektrostatik güç ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu aşamada bakteri hala Brown hareketi gösterir ve çok az bir durulama gibi kesici güç akımları ile ortadan kaldırılabılır [Marshall ve ark., 1971]. Hücrelerin irreversibl tutunması ise biyofilm oluşumundaki bir sonraki çok önemli basamaktır. İtici güçler bakteri hücrelerinin yüzeye direkt kontaktını engeller. Ancak bakterilerin flagella, fimbria ve pili gibi yüzey uzantılarını ve ekzopolisakkarit fibrillerinin üretiminden dolayı yüzeye kontakt devam eder [Jones ve Isaacson, 1983; Hancock, 1991]. Geri dönüşümsüz tutunma dipol dipol etkileşimi, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içeren kısa mesafede etkili çeşitli güçleri içerir. Bakteri hücresiyle yüzey arasında köprü görevi gören polimerik fibriller yüzeye geri dönüşümsüz tutunmaya olanak sağlar. Bu süreçte hücrelerin yüzeye ilişkisinin kesilmesi ortadan kaldırılması için fırçalama ve ovalama gibi çok güçlü kuvvetler gereklidir [Marshall ve ark., 1971].

### *Mikrokoloni oluşumu*

Geri dönüşümsüz tutunan bakteri hücreleri bu şartlar altında büyür ve bölünür. Bu da mikrokolonilerin oluşumuna neden olur. Bu periyotta yapışan hücreler polimer (EPS) üretimi gerçekleştirir. Polimer üretimi hücrelerin yüzeye sabitlenmesini ve çevreden gelen bozucu etkilere karşı koymasını sağlar [Characklis ve Marshall, 1990].

### *Biyofilm oluşumu*

Yüzeye bakteriyel tutunmanın devam etmesi ve bunu takiben bakteri gelişimi ile beraber EPS üretimi biyofilm oluşumuna neden olur. Biyofilm oluşumu oldukça yavaş bir süreçtir ve kültür şartlarına bağlı olarak oldukça uzun bir süreçte milimetrik bir kalınlığa ulaşır [Melo ve ark., 1992].

#### **2.2.4. Biyofilm oluşumun klinik önemi**

Biyofilmlerin öneminin anlaşılması ve bu yönde yapılan çalışmalar son 30 yıldır hız kazanmıştır. Vücut içerisinde biyofilm oluşumu önem taşımaktadır. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölümlere bile neden olabilirler. Birçok biyomalzeme üzerinde tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olurlar. Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler [Costerton ve ark., 1999].

Klinik olarak biyofilmler canlı dokularda ve vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşabilirler.

#### Canlı dokularda oluşan biyofilmler

Patojen mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için genellikle canlı dokulara tutunurlar. Mikroorganizmaların tutunması için uygun proteinlere sahip olan canlı doku, aynı zamanda mikroorganizmaların beslenebilmesi

için önemli olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunan bakteriler uygun yaşam şartları nedeniyle çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Normal bir bakteriyel floranın patojenik hale geçmesi de söz konusu olabilir. Bu geçiş, doku yüzey kimyasındaki değişimlerle, antibiyotik tedavisiyle veya yaşlanma sonucu ortaya çıkabilir. Patojen olmayan (saprofit) mikroorganizmalar normalde buldukları ortamdan farklı bir bölgeye yerleştiklerinde patojen hale geçebilirler. Yer değişikliği sonucunda aşırı üreme ve buna bağlı olarak zehirli atık üretiminin artması zararsız mikroorganizmaları zararlı hale getirmektedir. Mikroorganizmalar yapışkan polimerler üretilip, fimbria gibi yüzey bileşenlerini kullandıklarından kuvvetli bir yapışma özelliğine sahiptir. Böylece buldukları ortamdaki sıvı akışı (örneğin kan) ve mekanik hareket gibi onlar için olumsuz fiziksel şartlardan korunurlar [Jefferson, 2004].

#### Vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşan biyofilmler

Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler kullanılmaktadır. Yapay deri, damar, kalp, eklem gibi birçok protez bu malzemelerden üretilmektedir. Biyomalzemelerin vücut tarafından kabul edilmesi için biyouyumlu olmaları gerekmektedir. Biyouyumlu malzemeler, doku yapısına benzer yapıda olup vücudun bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeyen malzemelerdir. Fakat vücudun kabul ettiği malzemeler aynı zamanda bakteriler için de elverişli olabilir. Örneğin vücut hücrelerinin malzemeyi kaplaması için fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler kullanılır. Bu proteinler sadece vücut hücreleri için değil, bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedir. Fakat bazı durumlarda bu fonksiyon farklılaşabilmektedir. Örneğin fibronektin yüksek derişimlerde vücut hücreleri için bağlayıcı özelliğini korumakta, ancak bakteri hücreleri için bu fonksiyonunu kaybetmektedir. Mikroorganizmaların sentetik malzemelere tutunarak sağladıkları en önemli avantaj, canlı dokudaki bağışıklık sistemi ile karşı karşıya gelmemeleridir. Bunun dışında, malzemede bulunan bazı metaller ( $Al_3^+$ ,  $Mg_2^+$ ), mikroorganizmaların oluşturduğu hücre dışı polisakkarit matris için destek malzeme oluşturur. Böylece mikroorganizmalar olumsuz dış koşullara karşı daha dayanıklı hale gelir [Costerton ve ark., 1999]. Biyomalzemeye

patojen bakteriler iki şekilde ulaşabilir. Birinci yol, üretim veya implantasyon sırasında malzemenin bakterilerle temas ederek enfekte olması ve vücuda bu şekilde yerleşmesidir. İkinci yol ise vücut içerisinde bulunan veya vücudun dış ortama açık kısımlarından (ağız, burun, vb.) vücuda ulaşan mikroorganizmaların vücut sıvıları yoluyla malzemeye ulaşması şeklindedir. İmplantların reddedilmesini önlemek amacıyla implant yerleştirildikten sonra bağışıklık sistemi baskılanır, ancak bu durum enfeksiyon riskini de artırır.

### Biyofilmler İle İlgili Enfeksiyonlar

“Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)”, tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonların oranın %65 olarak açıklamıştır [Costerton ve ark., 1999].

Biyofilmler ile ilişkili enfeksiyonların bulunma sıklığı ve modelini belirlemek güçtür. Ancak biyofilmlerin, dental plak, üst solunum yolu enfeksiyonları, peritonit, ürogenital enfeksiyonlar ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi birçok durum ile ilgili oldukları söylenebilir [Williams, 2006]. Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik enfeksiyonlara kadar çok geniş bir yelpazede rol oynamaktadırlar. Bu çalışmalar arasında biyofilm belirleyen genetik modülasyonlar kadar, biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmeye ve biyofilmi eradike etmeye yönelik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. viridans*, Enterokoklar, Aktinomiçesler, *E coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *V. cholerae*, *Klebsiella* spp. ve *Candida* spp. gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeylere adheransının, biyofilm oluşturmayan bakterilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir.

### Biyofilmin Antibiyotiklere Karşı Direnci

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, konak cevabından kurtulup antibiyotik tedavisine direnç göstermeleridir. Laboratuvar koşullarında (in vitro) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik

konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur [Stewart ve Costerton, 2001]. Vücut içinde (in vivo) antibiyotikler serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon riskini azaltabilir, fakat antibiyotik tedavisi kesildiği anda biyofilm oluşumu yeniden gözlenir.

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturduğunda, antimikrobiyalere karşı oldukça dirençlidir. Biyofilmi oluşturan her mikroorganizma tek başına bulunduğu anda, herhangi bir antimikrobiyal ile kolayca inhibe olmasına rağmen biyofilm mimarisi içinde yer aldığı zaman aynı antimikrobiyal ile inhibe etmek oldukça zordur [Durack ve Beeson, 1972]. Biyofilm oluştuğu zaman onu yüzeyden ayırmak son derece güçtür ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir [Bunce ve ark., 1992]. Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilm içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfaktan ve germisid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermektedir. Direnç gösterme mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir [Patti ve ark., 1994].

#### Antimikrobiyal ajanının biyofilm matriksinde çok yavaş ilerlemesi

Antimikrobiyal ajanların hücreleri inaktive edebilmesi için, biyofilm matriksi içerisinde yayılması gerekmektedir. Biyofilm matriksini oluşturan ekstrasellüler polimerik maddeler antimikrobiyal molekülerin yayılım hızını yavaşlatan ya da matriks ajanlarıyla ilişkisini kesen bariyer görevi görmektedir [Patti ve ark., 1994].

#### Biyofilm organizmalarının üreme hızlarının değişmesi

Biyofilm hücrelerinin planktonik fazdaki hücrelere göre çok yavaş çoğaldığı bu nedenle antimikrobiyal ajanları çok daha yavaş hücre içine aldığı bildirilmektedir [Patti ve ark., 1994].



### 2.2.5. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi

Doğada ve gıda sistemlerinde mikroorganizmalar gelişimlerini ve yaşamlarını sürdürebilmek için uygun besinler, iyonlar ve diğer organik maddelerin temas halinde olduğu katı yüzeylere tutunurlar. Biyofilm ve biyolojik kirlenme temas halinde bulunan yüzeyler üzerinde ki gelişme ve biyolojik yapışmayla ilgili iki terimdir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Doğada ve gıda işletim sistemlerinde ortamda bulunan patojenlerin yüzeyle teması direk olarak kontamine olan yüzeylerle ya da indirek olarak hava kökenli partiküller aracılığı ile olur [Lindsay ve Holly, 1999].

Birçok patojen ve gıda kökenli bakteri gıdayla temas halindeki yüzeylere yapışabilme yeteneğindedir. Bu bakterilerden bazıları biyofilm oluşturmaya daha fazla eğilimlidirler. Bunlardan *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* en yaygın olanlarıdır [Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Bu nedenle temizlik ve dezenfeksiyon mikrobiyal oluşumun akümüülasyonunu önlemek için oldukça önemli işlemlerdir [Costerton ve ark., 1987]. Biyofilm oluşumu birçok endüstride problemlere yol açar. Özellikle atık su arıtma sistemleri ve gıda endüstrilerini yakından ilgilendirir.

Boru sistemleri içerisindeki biyofilm oluşumu sistemdeki sıvı akışının azalmasına neden olur. Ve bu kirliliğin artışıyla ısı geçişleri düşer, ürünler kontamine olur ve ayrıca biyofilm oluşumuyla meydana gelen asit üretimi sistemdeki boruların aşınmasına yol açar. Biyofilm oluşumunda yaygın kaynaklar; atık su boruları, boruların bağlantı yerleri, lastik contalar, taşıma bantları, paslanmaz çelik ve benzeri yüzeylerdir [Fletcher, 1988]. Su dağıtım sistemlerindeki biyofilmler koliform grubu bakterilerden oluşur ve bu oluşumlar boru aşınımına, suda tat ve koku değişimine yol açarlar. Boru sistemlerinde oluşan biyofilmler bu sistemlerdeki suyun kullanımı sonucunda ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirebilmektedir. Boru içinde oluşan filmler daha çok borunun alt kısmında seyrek ve rastgele yerleşmiştir. Borunun üst kısımlarında hava akımı ve besinsizlik nedeniyle film oluşumu görülmemektedir [Lethola ve ark., 2007].

*Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlerle kontamine gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı bakımından da büyük sorun olduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, bulaşma için çapraz kontaminasyonun, personel ve çiftlik hijyeninin önemini ikinci plana iten, üretim alanında yüzeylere yapışan bakterilerin varlığı ortaya konmuştur [Denes ve ark., 1999; Denes ve ark., 2002].

Gıda işletim sistemlerinde ise biyofilm oluşumu gıdaların ve ekipmanın kontamine olmasına neden olur [Matilla-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Gıda teknolojisinde biyofilm oluşumu insan sağlığı açısından oldukça önemli olup, gıdayla temas halinde bulunan yüzeylerde bakteriyel yapışma gıdalarda bozulma ve bozulmaya bağlı olarak hijyen problemlerine ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır [Dunsmore ve ark., 1981]. Elverişli şartlar altında bakteri hücreleri yüzeylere tutunup üreme gösterebilir. Bu tür mikroorganizmalar tamamen ortamdan uzaklaştırılmadıkları sürece gıdaların güvenliğini ve kalitesini etkileyecek biyofilmler oluştururlar. Gıda endüstrisinde temizlik ve sanitasyon prosedürlerinin limiti ekipmanların yüzeyinde biofilm oluşumuna neden olan mikroorganizmaların akümülyasyonudur, ancak biyofilm oluşturan mikroorganizmaların akümülyasyonunun direnci işletim sonrası kontaminasyona ve ürünlerin raf ömrünün kısalması gibi sorunlara yol açmaktadır [Holah ve Kearney, 1992]. Gıda kökenli patojenler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar tipik olarak gıda işletim çevrelerinde bulunan paslanmaz çelik alüminyum, cam, buna-N, teflon ve naylon materyaller üzerinde biyofilm olarak birikmektedir. Naylon ve teflon yüzeyler pürüzsüz bir yüzeye sahipken paslanmaz çelik yüzey bakterileri tuzağına düşürmek için elverişli olan çatlak ve yarıklardan dolayı pürüzlü bir yapıya sahiptir.

Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, üretilen besinin proteinleri (kazein, jelatin), üretimde kullanılan teçhizat (reaktör, kazan, tepsi, vb.) üzerinde hazırlayıcı bir film oluşturarak mikroorganizma yapışmasını kolaylaştırırlar. Böylece mikroorganizmalar paslanmaz çelik, cam, alüminyum, teflon, naylon gibi gıda teknolojisinde kullanılan birçok malzeme üzerinde film oluşturarak insan sağlığını

tehdit edebilir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Yine benzer şekilde süt ve süt ürünleri endüstrisinde uygun olamayan temizlik ve sanitasyon ekipmanları ve hava kökenli mikroflora genellikle süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonunun ana kaynağını olarak dikkate alınmaktadır [Poulsen, 1999].

Süt ve gıda endüstrisinde biyolojik kirlenme yüzey çapraz ısı akımının engellenmesi, yüzeydeki akıcı sürtünme direncindeki artma ve enerji ve ürün kaybına sebep veren aşındırma oranındaki artma gibi ciddi problemlere neden olur. Mesela sıcaklık değişimi durumunda biyofilimler hem sıvı akımına hem de sıcaklık transferindeki direncin artmasına neden olur [Dunsmore ve ark., 1981]. Buna ek olarak biyofilimler, bozulmaya neden olan ve patojen mikroflorayı içeren, kümes hayvanı etleri ya da diğer et yüzeyleri gibi gıda yüzeylerinde oluşan çapraz kontaminasyon ve işletim sonrası kontaminasyonda problem arz eden oluşumlardır.

*Aeromonas*' lar sucul bitki ve hayvanlarda olduğu kadar gıda işletim sistemlerinde ve su dağıtım sistemlerinde de kolonize olur ve biyofilm oluştururlar. Son alışmalar iki farklı flegeller sisteme sahip olan *Aeromonas*' ların, flegellalarının plastik yüzeylerde biyofilm oluşturduğunu göstermiştir [Gavin ve ark., 2003].

Yüksek sıcaklıklarda gelişebilen ve süt teknolojisi açısından önemli bir bakteri olarak *Streptococcus thermophilus*' un süt işletim sistemi ekipmanlar içindeki ısı değiştiriciler üzerine tutunabildiği tespit edilmiştir. Bilindiği gibi sütün pastörizasyonu sırasında sporlar lmemekte, sadece vejetatif mikroorganizmalar yok edilebilmektedir. Dolayısıyla sütte *Bacillus cereus* sporları bulunabilmektedir. Sporlar hidrofobik karakterde olup boru yüzeyine tutunmakta ve ürettikleri ısıya dayanıklı toksinleri ile ciddi problemlere yol açmaktadır [Anderson ve ark., 1999].

*Salmonella* gıda kökenli patojenler arasında en önemli olanlardan birisidir. Uzun süren çalışmalar bu bakterinin farklı yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturabilme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. Özellikle tavuk ve kırmızı et gibi gıdalarda *Salmonella*' nın kollejen fibrillere tutunma gösterdiği gözlemlenmiştir [Anderson ve ark., 1999].

*Listeria monocytogenes* et, süt ve çeşitli gıdalarda da biyofilm oluşturabilmektedir [Criado ve ark., 1994]. Gıda kökenli bir patojen olarak gıda endüstrisi açısından büyük önem taşıyan *Listeria monocytogenes*' in paslanmaz elik yüzeyle yapışmasını ve yapışmayı sağlayan fibril üretimini gözlemlemişlerdir. Patojenin aynı zamanda cam poripropilen ve plastik yüzeyle de tutunduğu ve cam Buna-N ve plastik yzeylede sanitizelere karşı dirençli biyofilm ürettiği görülmüştür [Herald ve Zottola, 1988; Mafu ve ark., 1990].

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çiğ süt ve peynir örnekleri

Araştırmamızda süt fabrikasından temin edilen 80 çiğ süt örneği ve Ankara'nın çeşitli semt pazarlarından toplanan 80 peynir örneği materyal olarak kullanılmıştır. Çiğ süt ve peynir örnekleri tat ve koku değişimine neden olmayacak ve örneklerin mikrobiyal yükünü etkilemeyecek steril kaplara alınarak  $0^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklık koşullarında laboratuvar ortamına getirilerek aynı gün içerisinde çalışılmıştır.

##### 3.1.2. *Listeria* türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyerleri

Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Listeria* türlerini izole etmek amacı ile half fraser broth base, fraser broth base, palcam agar ve yeast extract'lı tryptic soy agar (YE-TSA) besiyerlerinden yararlanılmıştır.

##### Half Fraser / Fraser Broth Base (Oxoid CM0895)

Protease peptone	5gr
Tryptone	5gr
Lab-Lemco powder	5gr
Yeast extract	5gr
Sodium chloride	20gr
Di-sodium hydrogen phosphate	12gr
Potassium dihydrogen phosphate	1,35gr
Eskulin	1gr

Lithium chloride	3gr
Distile su	1000ml

pH=7,2±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden besiyeri uygun sıcaklığa getirildikten sonra (50 °C) besiyerine özel supplement eklenip tüplere 10'ar ml pipetlenmiştir.

#### Fraser Supplement (Oxoid SR0156)

Ferric ammonium citrate	0,25 gr
Nalidixic acid	10 mg
Acriflavine hydrochloride	12,5gr

Sterilize edilmiş uygun sıcaklıktaki 500 ml Fraser Broth besiyerine steril koşullarda ilave edilmiştir.

#### Palcam Agar (Merck 1.11755)

Peptone	23gr
Yeast extract	3gr
Starch	1gr
NaCl	5gr
Agar-agar	13gr
D(-) Mannitol	10gr
Ammonium iron (III) citrate	0,5 gr
Esculin	0,8gr

Glucose	0,5gr
Lithium chloride	15gr
Phenol red	0,08gr
Distile su	1000ml

pH=7,3±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup, üzerine 1 şişe selektif supplement ilave edilip homojenize olması sağlanarak steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

#### Yeast Ekstrakt'lı Triptik Soy Agar (LAB M MC 1, Oxoid CM 131)

Tryptone soy broth	30 gr
Yeast extract	6 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

pH=7,3±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C de 15-20 dakika steril edilmiştir. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

### **3.2. Metod**

Aseptik olarak alınıp soğuk zincir altında laboratuvara getirilen örneklerde *Listeria* türlerinin varlığı ISO 11290-1/A1-2004 metodu kullanılarak araştırılmıştır.

Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Listeria* türlerinin izolasyonu ve teşhisi için ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme işlemlerinden sonra katı besiyerine tek

koloni yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Ön zenginleştirme amacı ile incelenen çiğ süt (10 ml) ve peynir (10 gr) örnekleri, 1/10 seyrelme oranı ile half fraser broth base içinde homojenize edilerek 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ön zenginleştirme sıvısından 0,1 ml alınan örnek selektif zenginleştirme sıvısında (fraser broth base) 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda selektif zenginleştirme sıvısından bir öze dolusu örnek palcam agar’a tek koloni ekim yöntemi ile ekim yapılarak 37°C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyeri üzerinde üreyen tipik zeytin yeşili renkte siyah zonlu koloniler *Listeria* şüpheli koloniler olarak seçilmiş ve saflaştırılmak üzere yeast ekstrakt’lı tryptic soy agar’a (YE-TSA) pasajları yapılmıştır.

Bu çalışmada standart suş olarak *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), *Listeria innocua* (ATCC 33090) kullanılmıştır. Bu izolatlar materyal ve metotda anlatılan tüm besiyerlerine ekim yapılarak biyokimyasal reaksiyonlar ile morfolojik özellikleri karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

### **3.2.1. Koloni değerlendirilmesi ve *Listeria* türlerinin teşhisi**

Palcam agar’da 37°C’de 48-72 saat sonunda üreyen tipik zeytin yeşili renkte siyah zonlu koloniler *Listeria* spp. şüphesiyle değerlendirilmiş ve bu kolonilerden bazıları seçilerek cins ve tür düzeyindeki teşhisleri için biyokimyasal testleri yapılmak üzere YE-TSA’ya inoküle edilmiştir (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Üreyen kolonilere Gram boyama ve SIM medium’da hareket testleri uygulanmıştır. Hareketli ve Gram pozitif olan izolatlara oksidaz, katalaz ve metil red-voges proskauer testleri yapılmıştır (Çizelge 3.1). Cins düzeyinde tanımlanan *Listeria*’ların tür seviyesinde teşhis edilmeleri için ise Çizelge 3.2.’de de belirtilen nitrat redüksiyon, karbonhidrat fermentasyon (mannitol, ksiloz, ramnoz), kanlı agar’da hemoliz ve CAMP testlerine geçilmiştir.



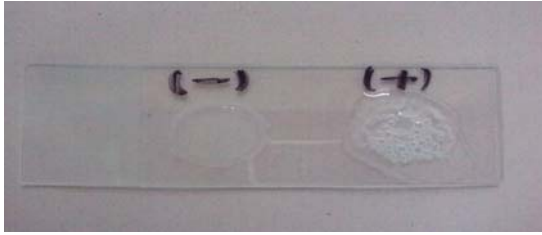
### 3.2.2. *Listeria* türlerinin teşhisi ve biyokimyasal ayrımında kullanılan testler

#### Gram boyama

Saf kültürden preparat hazırlanarak klasik Gram boyama yöntemi ile boyandıktan sonra Gram (+), uçları yuvarlak veya kokobasil formunda görünen mikroorganizmalar *Listeria* şüpheli koloniler olarak değerlendirilmiştir.

#### Katalaz testi

Stok kültür üzerinde üreyen koloniler temiz bir lam üzerinde serum fizyolojik içinde süspanse edilerek üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmıştır. Kabarcıklarının görülmesi halinde test pozitif kabul edilmiştir (Resim 3.1.).



Resim 3.1. Katalaz Testi

#### Kovac's Oxidase Testi

Tetramethy-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 gr

Distile su 100 ml

Distile su içine tetra methy-p-phenylenediamine dihydrochloride ilave edilerek hazırlanmıştır. Stok kültürden alınan 1 öze bakteri Whatman filtre kağıdına sürülerek üzerine Kovac's ayracı damlatılmış ve 1-2 dakika içinde mavi-mor renk pozitif olarak, pembe renkte negatif olarak değerlendirilmiştir [Kovaks, 1956], (Resim 3.2.).



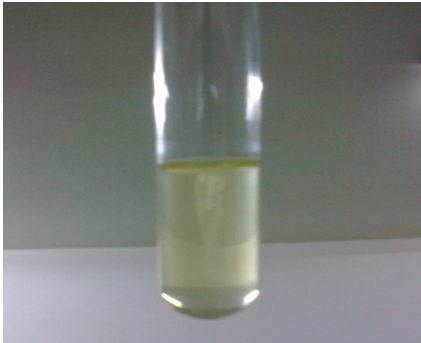
Resim 3.2. Oksidaz (+), oksidaz (-)

### Hareket testi

#### *SIM besiyeri (Merck 1.05470)*

Peptone from casein:	20 g
Peptone from meat:	6,6 g
Ammonium iron (III) citrate:	0,2 g
Sodyum thiosülfate:	0,2 g
Agar-agar:	3,0 g

pH=7.3±02'ye ayarlanıp 30 gr besiyeri 1000 ml distile suda eritilip tüplere 9 ml pipetlendikten sonra otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir. Tüpler otoklavdan çıktıktan sonra dik olarak dondurulmuştur. Ekim yapıldıktan sonra 25°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ters çam ağacı tarzında ki üremeler hareketlilik pozitif olarak değerlendirilmiştir [Merck, 2000; Koneman ve ark., 1992], (Resim 3.3.).



Resim 3.3. Hareket Testi (Pozitif Sonuç)

### Hemoliz testi

#### Blood agar base (Oxoid CM 331)

Peptone:	23 g
Starch:	1 g
Sodium chloride:	5 g
Agar :	10 g
Distile su:	1000 ml

pH=7,3±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C de 15-20 dakika steril edilmiştir. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup, %5'lik kan ilave edilerek homojenize olması sağlanarak steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

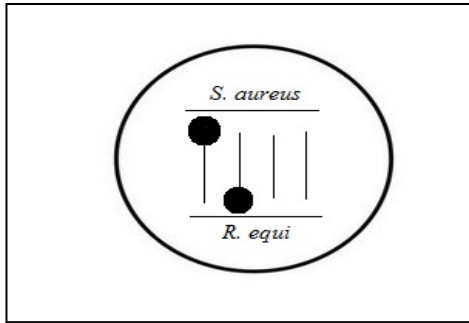
Kolonilerden çizme plak yöntemi ile ekim yapıp 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kanlı agardaki kolonilerin çevresinde oluşan açık renkli zon beta-hemoliz olarak değerlendirilmiştir.

### Test izolatları

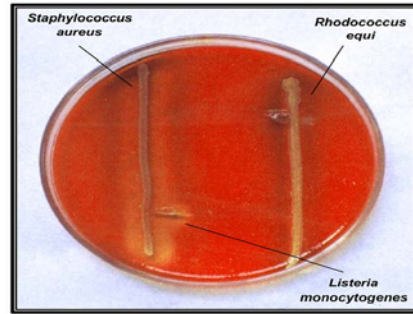
Bu çalışmada CAMP testinde belirleyici bir mikroorganizma olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* izolatu Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nden temin edilmiş, belirleyici diğer bir mikroorganizma olarak kullanılan *Rhodococcus equi* (ATCC 6939) izolatu ise ticari olarak satışa sunulmuş hazır suş halinde temin edilmiştir.

### CAMP (Christie, Atkins, Munch-petersen) Testi

Bu test  $\beta$ -hemolitik *Listeria* türlerinin (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) hemoliz özelliklerini incelemek ve dolayısıyla biyokimyasal ayrımını yapmak için uygulanmıştır. Bu amaçla koyun kanlı agar'ın üst yüzeyine *S. aureus*, alt yüzeyine de *R. equi* izolatlarından birer öze dolusu çizgi şeklinde ekim yapılmıştır (Resim 3.4.). Daha sonra *S. aureus* ve *R. equi*'nin ekim çizgisine değmemek koşulu ile 90 derecelik dik açı oluşturacak biçimde daha önce  $\beta$ -hemoliz pozitif olan *Listeria* kolonilerinden ekilmiştir ve 35°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Kanlı agar'da vertikal çizgilerin olduğu zonun yanındaki test kültürlerinde  $\beta$ -hemolize bakılmıştır (Şekil 3.1.). *S. aureus* tarafında açık ve net şemsiye şeklinde zon yapan izolatlar *L. monocytogenes* veya *L. seeligeri* olarak belirlenmiştir. Bu izolatların ayrımı için D-ksiloz testi uygulanmıştır. Eğer test edilen şüpheli izolat,  $\beta$ -hemoliz *S. aureus* ile CAMP (+), D-ksiloz (-) ise *L. monocytogenes*; CAMP (+), D-ksiloz (+) ise *L. seeligeri* olarak tanımlanmıştır. Yapılan CAMP testinde *R. equi* tarafında şemsiye şeklinde açık zon oluşturan izolatlar *L. ivanovii* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.1. CAMP testinin uygulanması



Resim 3.4. CAMP testinin kanlı agar'da görünümü

### Nitrat redüksiyon testi

Bu test için YE-TSA'dan alınan şüpheli koloniler nitrat agar'a inoküle edilmiş ve 37°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Test sonucunu değerlendirmek amacı ile tüpteki besiyerinin içerisine 1 ml solüsyon A, 1 ml solüsyon B'den pipetlenmiştir. Tüpte kırmızı rengin oluşumu pozitif nitrat redüksiyonunu göstermiştir.

Nitrat Agar

Peptone	10,0
Sodium chloride (NaCl)	5,0
Potasyum nitrate	2,0
Agar	3,0
pH	7,0

Ortam içeriği 1000 ml distile su içinde çözdürölür, 121 °C’de 15 dakika steril edilir.

Solüsyon A

Sülfanilic acid	0,8 g
Acetic acid (5N)	100 ml

Solüsyon B

$\alpha$ -naphthylmine	0,5 g
Acetik acid (5N)	100 ml

5N asetik asid’in hazırlanışı

Acetic acid	60 ml
Distile Su	140 ml

Karışım sonucunda 200 ml’lik 5N asetik asit elde edilmiştir. Bu karışımın 100 ml’si A solüsyonu için, 100 ml’si de B solüsyonu için kullanılmıştır.

Karbonhidrat fermentasyon testiPurple broth base (BD Difco 211558.)

Proteaz pepton	10 g
Beef ekstrakt	1 g
Sodyum klorid	5 g
Brom krezol moru	0,02 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri pH=6.8±0,2'ye ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra tüplere 9 ml pipetlenerek 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

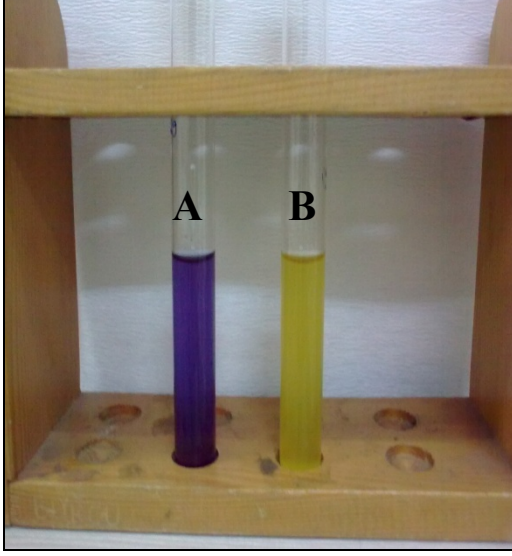
Karbonhidrat solüsyonu

Karbonhidrat (Mannitol, Ksiloz, Ramnoz)	1 g
Distile su	10 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Karbonhidrat temel besiyeri	9 ml
Karbonhidrat solüsyonu	1 ml

İzolatların %10'luk mannitol, ksiloz, ramnoz karbonhidrat fermentasyon besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Besiyerindeki brom krezol moru indikatörünün rengini sarıya dönüştüğü görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.5.).



Resim 3.5. Karbonhidrat fermentasyon testi  
A: Negatif sonuç B: Pozitif sonuç

### Metil Red Testi

Peptone from meat:	7 g
D(+) glukoz:	5 g
Fosfat buffer:	5 g

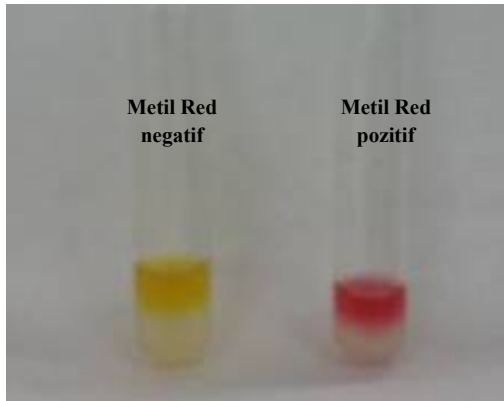
Temel besiyerinden 17 g 1000 ml distile su içinde eritilmiştir. pH:  $6,9 \pm 0,2$  ayarlanıp, tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

### Metil Red ayracı

Metil red:	0,1 g
%96'lık etil alkol:	300 ml
Distile su:	200 ml

Metil red etil alkol içerisinde çözüldürülmüş, daha sonra distile su ilave edilmiştir.

Sıvı besiyerine, YE-TSA besiyerinden öze ile alınan *Listeria* kolonileri eklenerek 35°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerine metil red ilave edilmiş ve kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.6.).



Resim 3.6. Metil Red Testi

### Voges-Proskauer Testi

Pepton from meat:	7 g
D(+) glukoz:	5 g
Fosfat buffer:	5 g

Temel besiyerinden 17 g 1000 ml distile su içinde eritilmiştir. pH: 6,9±0,2'ye ayarlanıp, tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

### VP test ayıraçları

#### A çözeltisi:

Alfa naftol:	5 g
--------------	-----



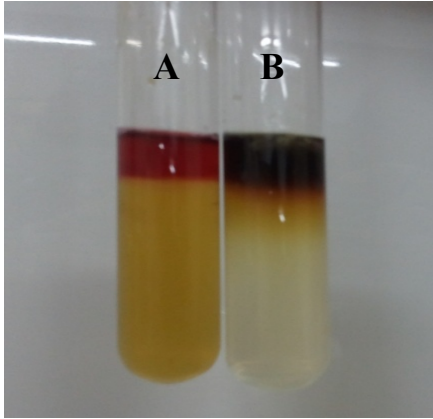
Etil alkol (%95): 100 ml

B çözeltisi:

Potasyum hidroksit: 40 g

Distile su: 100 ml

Voges Proskauer (MR-VP) sıvı besiyerine, YE-TSA besiyerinden öze ile alınan *Listeria* kolonileri eklenerek 35°C'de 48±2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda besiyerine A çözeltisinden 0,6 ml, B çözeltisinden 0,2 ml ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Test sonucunda pembe renk oluşumu (+), sarı renk oluşumu ise (-) olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.7.).

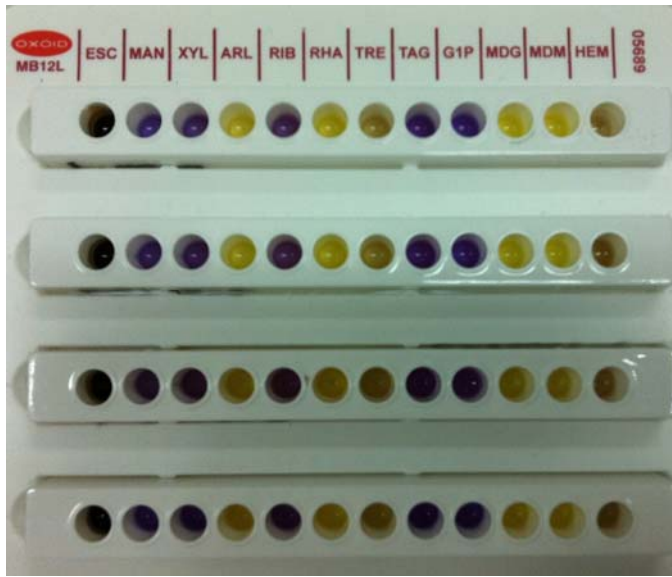


Resim 3.7. Voges-Proskauer Testi

A: Voges-Proskauer Pozitif

B: Voges-Proskauer Negatif

Yapılan cins ve tür düzeyindeki biyokimyasal testlerden sonra suşların doğruluğunu tespit etmek için Microbact *Listeria* 12L (Oxoid) bakteri tanımlama kiti kullanılmıştır.



(a)



(b)

Resim 3.8. Kitler ile tanımlanmış *Listeria* türleri (Oxoid)  
 a. Tanımlanmış *Listeria innocua* suşu  
 b. Tanımlanmış *Listeria monocytogenes* suşu

Çizelge 3.1. *Listeria*'ların cins düzeyinde ayırt edici bazı özellikleri

<b>Morfoloji</b>	<b><i>Tek tek veya kısa zincir</i></b>
Gram boyama	+
Katalaz	+
Oksidaz	+
Hareket	+
Metil-Red	+
<i>Voges-Proskauer</i>	+

Çizelge 3.2. *Listeria* türlerinin identifikasyonunda kullanılan testler (\*)

<b>Testler</b>	<b><i>L.monocytogenes</i></b>	<b><i>L. ivanovii</i></b>	<b><i>L. innocua</i></b>	<b><i>L. welshimeri</i></b>	<b><i>L. grayi</i></b>	<b><i>L. seeligeri</i></b>
Gram Boyama	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
SIM Motilite	+	+	+	+	+	+
Hemoliz	+	+	-	-	-	+
CAMP (S.aureus/R.equi)	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/-
Mannitol	-	-	-	-	+	-
L-Ramnoz	+	-	D	D	-	-
D-Ksiloz	-	+	-	+	-	+
MR/VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Nitrat Red.</i>	-	-	-	-	-	-

d: Değişken

\* Bergey's Manual of Determinative (2009)

### 3.3. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Ölçülmesi

#### 3.3.1. Mikroplate ile biyofilm ölçümü

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı metod geliştirilmiştir [Deighton ve ark., 2001; Arciola ve ark., 2002; Harraghy ve ark., 2006]. Biyofilm tayini öncelikle test tüpü duvarında biyofilm kültürü ve daha sonra boyama ile biyofilm tespiti şeklinde yapılmıştır [Christensen ve ark., 1982]. Daha sonra mikroplate kuyucukları diğer bir ölçüm aracı olarak kullanılmış ve sonuçlar spektrofotometre ile ölçülmüştür [Christensen ve ark., 1982]. Şu anda birkaç farklı metod kullanılmaktadır. Bunlar tüp testi [Mathur ve ark., 2006] , mikroplate testi [Stepanovic, 2000], radiolabeling mikroskopi [Deighton ve ark., 2001] ve Congo Red Agar testi [Arciola ve ark., 2002] gibi testlerdir. Buna rağmen mikroplate metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır [Stepanovic ve ark., 2007].

#### Biyofilm testi için bakteriyel suşların depolanması

Araştırmada kullanılan *Listeria* suşları stok kültürden alınarak aktiveleştirilmek üzere Tryptic Soy Broth (TSB)' a aktarıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası palcam agar'a alınan suşlardan seçilen koloniler ile biyofilm çalışması yapılmıştır.

#### İnokulasyon

İnokulasyondan önce, palcam agar'dan alınan test edilecek suşlar sıvı ya da katı ortamda kültür edilmiştir. Suşlar çalışılacak ortama göre TSB' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası seçilen 3-4 özdeş koloni 5 ml' lik sıvı besiyerine (TSB, TSB+% 1 NaCl, TSB+% 1 glikoz ) süspansiyeye edilip, çalkalamaksızın 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra durgun faz kültürü vortekslenip, 1/100 oranında dilüsyon yapılmış ve dilüsyonu yapılan bakteri tekrar vortekslenmiştir.

### Biyofilm kültürü

Sıvı besiyerinde gelişen bakteriden hazırlanan kültür sıvı besiyerine (TSB, TSB+% 1 NaCl, TSB+% 1 glikoz) 1/100 oranında dilüe edilip, her bir kuyucuğa 200 µl dökülür. Negatif kontrol kuyucuğu yalnız sıvı besiyeri ile doldurulmuştur.

Biyofilm oluşturundaki fenotipik ifadenin in vitro koştullarda değişmeye oldukça müsait olmasından dolayı hataları minimize etmek için ve bilgilerin güvenilirliğini sağlamak için performe edilen testlerin her bir suşt için en az 3 kez tekrarlanıp, buna ek olarak her bir test de üç kez tekrarlanmıştır.

İnoküle edilen plateler kapağıyla kapatılıp ve uygun koştullar altında inkübasyona (24, 48 ve 72 saat) bırakılmıştır [Stepanovic ve ark., 2007], (Resim 3.9.).



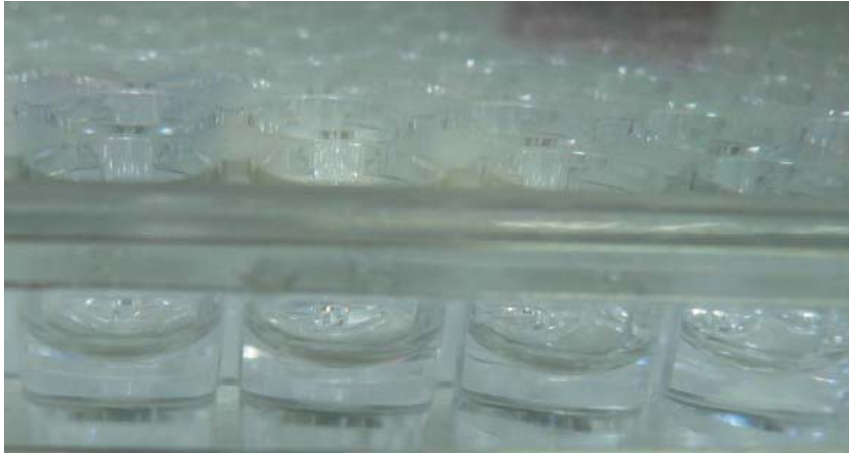
Resim 3.9. *Listeria* izolatlarının mikroplate içerisinde 30°C’de 24 saatlik İnkübasyonu

### Yıkama

İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği atık konteynırına boşaltılıp her bir kuyucuk üç kez 300 µl' lik steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi için mikropipet kullanılmıştır. Her yıkama aşamasından sonra fiske vurularak kuyucuklar boşaltılmıştır. Platelere kurumaya bırakılmak üzere ters çevrilmiştir [Stepanovic ve ark., 2007].

### Fiksasyon

Yıkamadan sonra yapışan bakterilerin kalıntısı 150 µl metanol ile 20 dakikalık fiksasyondan sonra mikroplateler boşaltılıp tek bir fiske vurulup bir gece ters pozisyonda oda sıcaklığında hava ile kurumaya bırakılmıştır [Stepanovic ve ark., 2007], (Resim 3.10.).

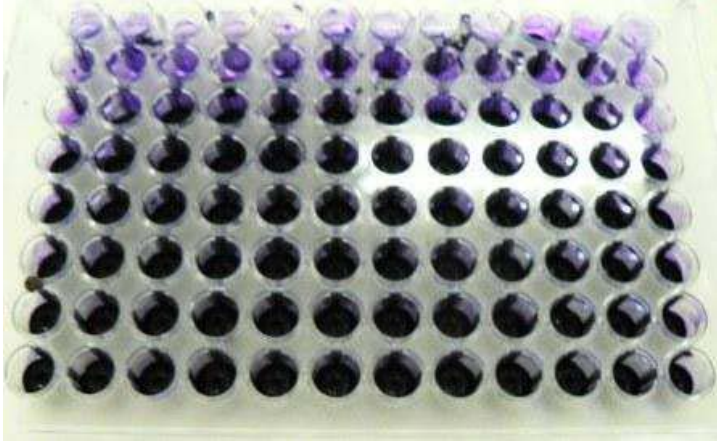


Resim 3.10. Yıkama sonrası metanol fiksasyonu

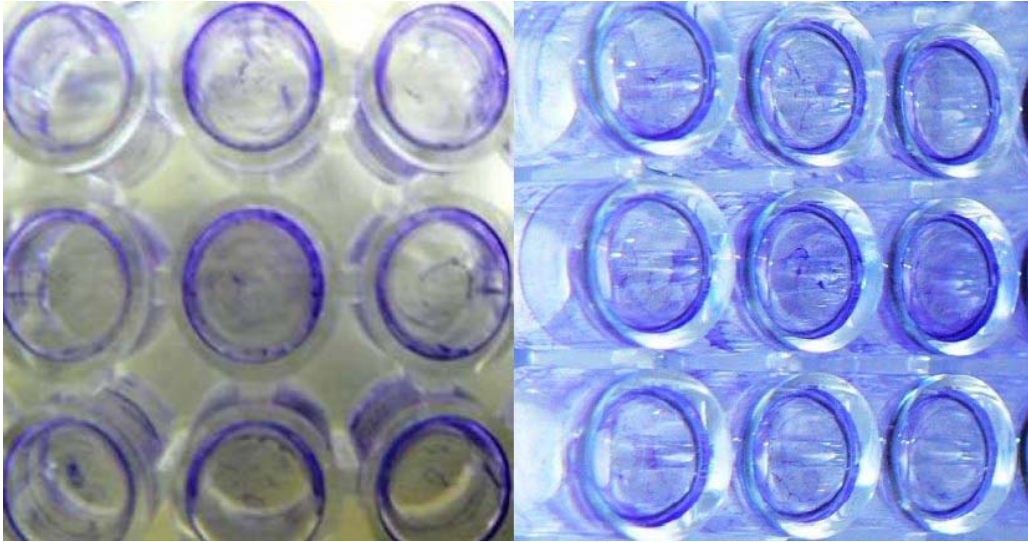
### Boyama

Oluşan biyofilm tabakası her bir mikroplate kuyucuğu 150 mikro litre kristal viyole kullanılarak boyanmış ( 15 dak., oda sıcaklığında), boyamadan sonra boyanın fazlası pipetle çekilip geri kalan kısım mikroplateler akan su altına tutularak yıkanmıştır

(Resim 3.11., 3.12.). Boya temizlenene kadar yıkamaya devam edilmiştir [Stepanovic ve ark., 2007].



Resim 3.11. Kristal viyole ile yapılan boyama

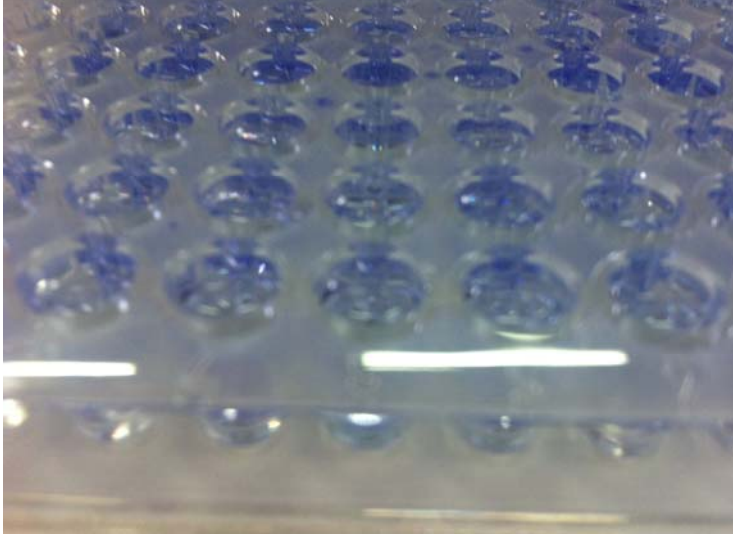


Resim 3.12. Boyama sonrası kurutulanan mikroplatelerin tabanındaki biyofilm oluşumunun görünümü

#### Boyanın geri çözdürülmesi

Mikroplateler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hücelere bağlanan boya geri çözdürülmek üzere her kuyucuktaki boya % 33'luk glasiyel asetik asit ile çözdürülmüştür. Mikroplatelerin havayla temasını önlemek için kapakları kapatılıp

oda sıcaklığında en az 30 dakika çalkalamaksızın beklenmiştir (Resim 3.13). Glasiyel asetik asit eklenmesi kuyucukların hem tavan hem de duvarlarına yapışan bakterilerin indirekt ölçülmesinde olanak sağlamaktadır. Alternatif olarak % 95' lik etanol kullanılabilir [Stepanovic ve ark., 2007].



Resim 3.13. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücrelerinin tuttuğu boyanın geri çözdürülmesi

#### Sonuçların ölçülmesi

Kristal violet ile boyanan kuyucuklardaki boya glasiyel asetik asit ile çözdürüldükten sonra her bir kuyucuktaki Optik yoğunluk (OD) 570 nm' de mikroplate okuyucuda ölçülmüştür [Stepanovic ve ark., 2007].

Sonuçlar TSB, TSB+%1 NaCl, TSB+%1 glikoz' daki negatif kontrollerin ortalamasına göre değerlendirilmiştir. Buna göre; her bir aralık negatif kontrolün sırayla bir, iki ve dört katı olacak şekilde belirlenmiştir.



Çizelge 3.3. TSB besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

TSB								
24*			48*			72*		
... <	(-)	< 0,068	... <	(-)	< 0,080	... <	(-)	< 0,085
0,068<	(+)	< 0,136	0,080<	(+)	< 0,160	0,085<	(+)	< 0,170
0,136<	(++)	< 0,272	0,160<	(++)	< 0,320	0,170<	(++)	< 0,340
0,272<	(+++)	< ...	0,320<	(+++)	< ...	0,340<	(+++)	< ...

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

\*TSB: Tryptic Soy Broth

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 3.4. TSB+% 1 NaCl besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

TSB+% 1 NaCl								
24*			48*			72*		
... <	(-)	< 0,073	... <	(-)	< 0,083	... <	(-)	< 0,088
0,073<	(+)	< 0,146	0,083<	(+)	< 0,166	0,088<	(+)	< 0,176
0,146<	(++)	< 0,292	0,166<	(++)	< 0,332	0,176<	(++)	< 0,352
0,292<	(+++)	< ...	0,332<	(+++)	< ...	0,352<	(+++)	< ...

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

\*TSB+% 1 NaCl: % 1 NaCl içeren Tryptic Soy Broth

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 3.5. TSB+% 1 glikoz besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

TSB+% 1 glikoz								
24*			48*			72*		
... <	(-)	< 0,084	... <	(-)	< 0,089	... <	(-)	< 0,086
0,084<	(+)	< 0,168	0,089<	(+)	< 0,178	0,086<	(+)	< 0,172
0,168<	(++)	< 0,336	0,178<	(++)	< 0,356	0,172<	(++)	< 0,344
0,336<	(+++)	< ...	0,356<	(+++)	< ...	0,344<	(+++)	< ...

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

\*TSB+% 1 glikoz: % 1 glikoz içeren Tryptic Soy Broth

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen ve tanımlanan *Listeria* türlerinin çalışılan örnek sayısı ve izolasyon sayısı Çizelge 4.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* izolatlarının çalışılan örnek sayısına göre dağılımı

Kaynak	Örnek sayısı	İzolasyon sayısı (%)
Çiğ süt	80	9 (11,25)
Peynir	80	6 (7,50)
<b>Toplam</b>	160	15 (9,37)

Not: Yüzde değerleri çalışılan örnek sayısına göre alınmıştır.

Çizelge 4.1’e göre, araştırmada incelediğimiz 80 çiğ süt örneğinden 9 (%11,25), 80 peynir örneğinden de 6 (%7,50) *Listeria* spp.izolatı elde edilmiştir. Ayrıca standart suşlar olan *L. monocytogenes* (ATCC 19114) ve *L. innocua* (33090) ile beraber toplam 17 izolat incelenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *L. monocytogenes* ve *L. innocua* ATCC suşları

No	Suş isimleri	<i>Listeria</i> spp.	Kaynak
1.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114
2.	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090

Çizelge 4.3. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* izolatlarının türlere göre dağılımı

Gıda örneği	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welchimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>	Toplam
Çiğ Süt	-	7	-	1	-	1	9
Peynir	-	4	-	-	-	2	6
<b>Toplam</b>	-	<b>11</b>	-	<b>1</b>	-	<b>3</b>	<b>15</b>

Bu araştırmada izole edilen toplam 15 *Listeria* izolatı tür dağılımı olarak incelendiğinde; 11'i *L. innocua*, 3'ü *L. grayi* ve 1'i de *L. welchimeri* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar incelenen gıda örneğine göre değerlendirildiğinde; çiğ süt örneklerinde bulunan toplam 9 *Listeria* izolatının 7'sinin *L. innocua*, 1'inin *L. welchimeri*, 1'inin de *L. grayi*; peynir örneklerinde bulunan toplam 6 izolatın da 4'ünün *L. innocua*, 2'sinin de *L. grayi* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

İzole edilen toplam 15 *Listeria* izolatı türlere göre bulunma sıklıkları değerlendirildiğinde çiğ süt ve peynir örneklerinde en fazla *L. innocua*'ya (%73,3) rastlanmıştır.

Çizelge 4.4. İzole edilen *Listeria* türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımı

Örnek çeşidi	No	İzolat no.	İzole edilen tür
Çiğ Süt	1	S10	<i>L. innocua</i>
	2	S20	<i>L. innocua</i>
	3	S31	<i>L. innocua</i>
	4	S33	<i>L. innocua</i>
	5	S42	<i>L. innocua</i>
	6	S51	<i>L. innocua</i>
	7	S55	<i>L. innocua</i>
	8	S34	<i>L. welshimeri</i>
	9	S30	<i>L. grayi</i>
Peynir	10	P9	<i>L. innocua</i>
	11	P24	<i>L. innocua</i>
	12	P30	<i>L. innocua</i>
	13	P44	<i>L. innocua</i>
	14	P29	<i>L. grayi</i>
	15	P70	<i>L. grayi</i>

## 4.2. Mikroplate İle Biyofilm Ölçümü Sonuçları

Çizelge 4.5. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
1	0,102/0,092/0,091	0,203	0,098/0,094/0,112	0,101	0,168/0,124/0,159	0,164
	0,080/0,112/0,089		0,094/0,097/0,093		0,139/0,125/0,174	
	0,233/0,092/0,117		0,102/0,112/0,110		0,173/0,208/0,213	
2	0,491/0,332/0,225	0,326	0,403/0,299/0,243	0,307	0,142/0,129/0,143	0,135
	0,416/0,280/0,242		0,468/0,293/0,166		0,130/0,141/0,120	
	0,232/0,257/0,463		0,227/0,290/0,378		0,127/0,147/0,138	
3	0,301/0,313/0,233	0,307	0,617/0,183/0,189	0,212	0,123/0,119/0,110	0,111
	0,147/0,225/0,143		0,148/0,134/0,132		0,115/0,121/0,085	
	0,135/0,349/0,922		0,130/0,180/0,201		0,103/0,098/0,133	
4	0,384/0,334/0,277	0,350	0,301/0,265/0,172	0,199	0,118/0,121/0,106	0,112
	0,258/0,398/0,440		0,167/0,177/0,197		0,110/0,108/0,115	
	0,303/0,264/0,495		0,179/0,178/0,160		0,090/0,117/0,131	
5	1,291/1,178/0,883	1,016	0,997/0,649/0,837	0,911	0,127/0,119/0,118	0,113
	0,845/1,069/0,821		0,750/0,674/0,809		0,108/0,127/0,110	
	0,772/1,033/1,252		0,844/1,469/1,171		0,085/0,103/0,126	
6	0,607/0,559/0,728	0,700	0,282/0,332/0,292	0,361	0,156/0,120/0,121	0,134
	0,664/0,842/1,009		0,437/0,441/0,402		0,158/0,136/0,119	
	0,696/0,586/0,617		0,384/0,374/0,310		0,127/0,129/0,145	
7	0,283/0,255/0,390	0,332	0,326/0,288/0,267	0,338	0,212/0,152/0,136	0,168
	0,325/0,275/0,289		0,226/0,302/0,316		0,161/0,141/0,139	
	0,300/0,408/0,463		0,315/0,375/0,628		0,134/0,180/0,265	
8	0,702/0,330/0,636	0,578	0,334/0,208/0,363	0,337	0,112/0,123/0,114	0,118
	0,656/0,475/0,567		0,452/0,404/0,317		0,121/0,115/0,126	
	0,517/0,805/0,522		0,245/0,295/0,417		0,099/0,123/0,129	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 4.5. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No.	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
9	0,944/0,919/0,888	0,826	0,511/0,215/0,607	0,624	0,108/0,113/0,094	0,098
	0,887/0,876/0,954		0,605/0,858/0,726		0,101/0,085/0,099	
	1,201/0,174/0,598		0,523/0,835/0,740		0,098/0,079/0,105	
10	0,643/0,598/0,382	0,561	0,310/0,365/0,323	0,343	0,124/0,112/0,135	0,106
	0,409/0,546/0,501		0,334/0,440/0,337		0,109/0,096/0,097	
	0,459/0,591/0,922		0,385/0,311/0,292		0,093/0,095/0,096	
11	0,078/0,077/0,084	0,083	0,121/0,093/0,400	0,132	0,188/0,113/0,111	0,123
	0,069/0,091/0,087		0,096/0,138/0,082		0,124/0,111/0,105	
	0,076/0,073/0,112		0,091/0,092/0,082		0,107/0,122/0,129	
12	0,771/0,541/0,735	0,750	0,577/0,569/0,589	0,563	0,165/0,258/0,200	0,221
	0,579/0,787/0,506		0,625/0,490/0,548		0,284/0,258/0,246	
	0,570/1,433/0,828		0,640/0,398/0,631		0,203/0,188/0,190	
13	0,071/0,075/0,076	0,073	0,084/0,327/0,107	0,119	0,183/0,199/0,173	0,186
	0,077/0,073/0,083		0,092/0,097/0,091		0,246/0,198/0,252	
	0,071/0,072/0,065		0,091/0,089/0,096		0,215/0,099/0,116	
14	0,096/0,102/0,132	0,153	0,214/0,163/0,146	0,164	0,115/0,095/0,116	0,111
	0,170/0,157/0,197		0,143/0,190/0,140		0,129/0,138/0,105	
	0,139/0,195/0,193		0,121/0,237/0,126		0,107/0,108/0,092	
15	1,289/1,195/1,056	1,101	0,734/0,679/1,017	0,814	0,222/0,206/0,164	0,189
	1,091/0,717/0,938		0,875/0,634/0,706		0,156/0,159/0,191	
	1,213/1,374/1,040		0,746/0,985/0,954		0,203/0,171/0,233	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası



Çizelge 4.5. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No.	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
<b><i>L. mono.</i></b> <b>(ATCC)</b>	3,101/2,826/2,800	2,682	1,910/1,980/1,899	1,943	2,309/1,685/1,715	1,780
	2,934/2,603/1,915		1,987/2,000/1,915		1,617/1,647/1,574	
	2,698/2,788/2,480		1,989/1,900/1,911		1,590/1,907/1,979	
<b><i>L. innocua</i></b> <b>(ATCC)</b>	0,311/0,342/0,380	0,335	0,270/0,199/0,201	0,213	0,099/0,090/0,092	0,089
	0,299/0,345/0,345		0,210/0,200/0,222		0,090/0,084/0,083	
	0,301/0,305/0,389		0,201/0,203/0,211		0,090/0,089/0,085	
<b>Kontrol</b>	0,072/0,057/0,059	0,068	0,077/0,074/0,081	0,080	0,079/0,079/0,099	0,085
	0,090/0,064/0,070		0,072/0,084/0,094		0,076/0,082/0,097	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

*L. mono.*: *L. monocytogenes*

Çizelge 4.6. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 *Listeria* izolatının TSB’de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

İzolat no.	24*	48*	72*
1	++	+	+
2	+++	++	+
3	+++	++	+
4	+++	++	+
5	+++	+++	+
6	+++	+++	+
7	+++	+++	++
8	+++	++	+
9	++	++	+
10	++	+	+
11	++	++	+
12	+++	+++	+++
13	+	+	++
14	++	++	+
15	+++	+++	++

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin tutunma dereceleri TSB’deki negatif kontrollerin ortalamasına göre değerlendirilmiştir. Derecelendirmede kullanılan her bir aralık negatif kontrolün sırayla bir, iki ve dört katı olacak şekilde belirlenmiştir. Buna göre; 24, 48 ve 72 saatlik süre sonunda TSB’deki tutunma dereceleri:

a. 24 saat: .... Negatif (-)  $\leq 0,068 \leq$  Zayıf (+)  $\leq 0,136 \leq$  Orta (++)  $\leq 0,272 \leq$  İyi (+++) ....

b. 48 saat: .... Negatif (-)  $\leq 0,080 \leq$  Zayıf (+)  $\leq 0,160 \leq$  Orta (++)  $\leq 0,320 \leq$  İyi (+++) ....

c. 72 saat: .... Negatif (-)  $\leq 0,085 \leq$  Zayıf (+)  $\leq 0,170 \leq$  Orta (++)  $\leq 0,340 \leq$  İyi (+++) ....

Çizelge 4.7. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolot No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
1	0,209/0,124/0,100 0,119/0,102/0,088 0,091/0,112/0,131	0,119	0,293/0,189/0,155 0,164/0,183/0,178 0,159/0,160/0,260	0,193	0,267/0,132/0,124 0,119/0,097/0,010 0,122/0,113/0,141	0,125
2	0,271/0,136/0,136 0,167/0,151/0,144 0,129/0,160/0,174	0,163	0,593/0,157/0,196 0,194/0,214/0,201 0,193/0,223/0,234	0,245	0,437/0,112/0,099 0,098/0,082/0,111 0,102/0,116/0,094	0,139
3	0,268/0,172/0,137 0,180/0,191/0,233 0,189/0,179/0,168	0,190	0,297/0,152/0,184 0,199/0,239/0,139 0,238/0,207/0,202	0,206	0,228/0,102/0,076 0,115/0,123/0,114 0,089/0,091/0,106	0,116
4	0,247/0,135/0,140 0,126/0,139/0,164 0,141/0,133/0,134	0,151	0,201/0,150/0,137 0,109/0,113/0,156 0,116/0,150/0,193	0,141	0,166/0,105/0,099 0,095/0,105/0,097 0,102/0,114/0,110	0,110
5	0,640/0,337/0,341 0,346/0,404/0,291 0,339/0,392/0,464	0,394	0,450/0,380/0,399 0,411/0,233/0,311 0,333/0,348/0,374	0,399	0,193/0,131/0,169 0,134/0,134/0,134 0,130/0,115/0,128	0,140
6	0,573/0,194/0,208 0,178/0,214/0,232 0,179/0,203/0,210	0,243	0,251/0,138/0,330 0,181/0,198/0,167 0,190/0,196/0,195	0,205	0,209/0,123/0,164 0,149/0,125/0,122 0,086/0,203/0,118	0,144
7	0,815/0,392/0,525 0,418/0,368/0,403 0,411/0,379/0,420	0,459	2,117/0,996/0,514 0,389/0,330/0,331 0,302/0,383/0,472	0,648	0,299/0,174/0,184 0,183/0,178/0,187 0,187/0,222/0,448	0,229
8	0,521/0,312/0,295 0,337/0,232/0,260 0,282/0,283/0,292	0,312	0,910/0,279/0,186 0,191/0,160/0,225 0,137/0,219/0,224	0,281	0,129/0,167/0,124 0,130/0,146/0,152 0,160/0,153/0,198	0,151

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 4.7. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
9	0,381/0,306/0,274	0,269	0,764/0,200/0,201	0,241	0,107/0,110/0,101	0,102
	0,245/0,248/0,274		0,220/0,197/0,135		0,106/0,100/0,091	
	0,233/0,239/0,225		0,128/0,159/0,167		0,101/0,097/0,108	
10	0,321/0,161/0,194	0,202	0,151/0,145/0,158	0,157	0,108/0,101/0,118	0,099
	0,173/0,180/0,180		0,140/0,138/0,189		0,100/0,110/0,088	
	0,172/0,177/0,265		0,155/0,161/0,178		0,098/0,082/0,089	
11	0,668/0,306/0,252	0,291	0,302/0,229/0,168	0,221	0,113/0,120/0,111	0,119
	0,241/0,252/0,231		0,170/0,235/0,268		0,111/0,129/0,150	
	0,204/0,286/0,185		0,234/0,211/0,173		0,112/0,106/0,123	
12	0,817/0,604/0,458	0,518	1,148/0,483/0,394	0,452	0,647/0,408/0,384	0,453
	0,503/0,516/0,456		0,378/0,321/0,358		0,441/0,431/0,367	
	0,393/0,412/0,505		0,265/0,317/0,407		0,418/0,528/0,453	
13	0,144/0,134/0,113	0,111	0,142/0,113/0,097	0,097	0,252/0,171/0,232	0,277
	0,107/0,102/0,102		0,098/0,076/0,084		0,224/0,357/0,523	
	0,120/0,086/0,092		0,082/0,092/0,090		0,216/0,346/0,175	
14	0,090/0,105/0,091	0,094	0,125/0,128/0,137	0,100	0,084/0,121/0,104	0,102
	0,130/0,083/0,091		0,100/0,088/0,089		0,107/0,114/0,092	
	0,092/0,085/0,082		0,083/0,077/0,078		0,083/0,108/0,110	
15	0,090/0,105/0,091	0,617	1,444/0,728/0,626	0,655	0,686/0,559/0,467	0,544
	0,130/0,083/0,091		0,596/0,537/0,565		0,538/0,491/0,507	
	0,092/0,085/0,082		0,509/0,432/0,465		0,634/0,527/0,495	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 4.7. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolot No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
<i>L. mono.</i> (ATCC)	3,378/3,266/3,383	3,257	3,446/3,404/3,360	3,345	2,449/2,558/1,970	2,087
	3,221/3,052/3,219		3,361/3,334/3,302		2,345/1,843/1,958	
	3,273/3,208/3,318		3,313/3,290/3,296		1,711/1,909/2,047	
<i>L. innocua</i> (ATCC)	0,263/0,233/0,183	0,210	0,736/0,170/0,138	0,196	0,128/0,118/0,111	0,106
	0,183/0,183/0,181		0,139/0,110/0,125		0,116/0,095/0,093	
	0,228/0,238/0,201		0,137/0,119/0,093		0,095/0,105/0,098	
<b>Kontrol</b>	0,080/0,089/0,092	0,073	0,089/0,079/0,086	0,083	0,085/0,089/0,090	0,088
	0,059/0,059/0,064		0,083/0,077/0,086		0,095/0,082/0,089	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

*L. mono.*: *L. monocytogenes*

Çizelge 4.8. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 *Listeria* izolatının TSB+% 1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

İzolat no.	24*	48*	72
1	+	++	+
2	++	++	+
3	++	++	+
4	++	+	+
5	+++	+++	+
6	++	++	+
7	+++	+++	++
8	+++	++	+
9	++	++	+
10	++	+	+
11	++	++	+
12	+++	+++	+++
13	++	+	++
14	+	+	+
15	+++	+++	+++

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin tutunma dereceleri TSB+% 1 NaCl'deki negatif kontrollerin ortalamasına göre değerlendirilmiştir. Derecelendirmede kullanılan her bir aralık negatif kontrolün sırayla bir, iki ve dört katı olacak şekilde belirlenmiştir. Buna göre; 24, 48 ve 72 saatlik süre sonunda TSB+%1 NaCl'deki tutunma dereceleri:

a. 24 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,073  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,146  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,292  $\leq$  İyi (+++) ....

b. 48 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,083  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,166  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,332  $\leq$  İyi (+++) ....

c. 72 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,088  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,176  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,352  $\leq$  İyi (+++) ....

Çizelge 4.9. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
1	0,262/0,239/0,292	0,219	0,502/0,415/0,316	0,420	0,265/0,150/0,382	0,216
	0,219/0,241/0,179		0,455/0,529/0,342		0,164/0,180/0,196	
	0,167/0,191/0,189		0,395/0,341/0,486		0,172/0,287/0,153	
2	0,384/0,219/0,164	0,228	0,475/0,400/0,283	0,343	0,109/0,106/0,096/	0,116
	0,177/0,201/0,216		0,289/0,330/0,325		0,120/0,128/0,116	
	0,261/0,191/0,243		0,382/0,283/0,320		0,125/0,123/0,123	
3	0,279/0,178/0,178	0,189	0,282/0,240/0,238	0,266	0,153/0,138/0,197	0,127
	0,168/0,151/0,166		0,279/0,299 /0,300		0,124/0,120/0,121	
	0,201/0,184/0,198		0,280/0,241/0,240		0,127/0,128/0,140	
4	0,211/0,149/0,181	0,171	0,252/0,227/0,221	0,265	0,155/0,134/0,150	0,129
	0,165/0,165/0,150		0,346/0,292/0,172		0,122/0,119/0,118	
	0,188/0,175/0,159		0,219/0,378/0,285		0,137/0,116/0,114	
5	0,321/0,210/0,245	0,223	0,304/0,317/0,267	0,302	0,135/0,151/0,163	0,152
	0,241/0,247/0,175		0,472/0,244/0,299		0,166/0,183/0,152	
	0,177/0,210/0,186		0,328/0,210/0,281		0,109/0,151/0,158	
6	0,342/0,185/0,242	0,228	0,447/0,151/0,168	0,202	0,132/0,172/0,132	0,131
	0,205/0,205/0,266		0,211/0,216/0,186		0,142/0,141/0,106	
	0,211/0,230/0,167		0,133/0,171/0,229		0,129/0,116/0,114	
7	0,386/0,289/0,232	0,253	1,183/0,577/0,186	0,487	0,268/0,165/0,228	0,221
	0,216/0,273/0,258		0,245/0,353/0,330		0,249/0,208/0,207	
	0,231/0,207/0,188		0,368/0,411/0,738		0,217/0,211/0,237	
8	0,276/0,221/0,220	0,221	0,502/0,226/0,206	0,240	0,190/0,167/0,175	0,157
	0,221/0,249/0,203		0,155/0,198/0,192		0,157/0,146/0,144	
	0,208/0,223/0,174		0,199/0,221/0,268		0,160/0,128/0,154	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

Çizelge 4.9. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
9	0,232/0,342/0,272	0,213	0,601/0,223/0,193	0,240	0,129/0,139/0,125	0,118
	0,190/0,160/0,170		0,209/0,205/0,217		0,100/0,112/0,100	
	0,170/0,207/0,177		0,199/0,146/0,170		0,136/0,119/0,106	
10	0,316/0,177/0,350	0,339	0,506/0,382/0,575	0,430	0,161/0,123/0,118	0,136
	0,350/0,261/0,501		0,245/0,334/0,643		0,158/0,140/0,115	
	0,415/0,317/0,368		0,522/0,354/0,315		0,141/0,120/0,155	
11	0,243/0,245/0,421	0,420	0,989/0,442/0,701	0,631	0,161/0,188/0,167	0,170
	0,515/0,667/0,337		0,424/0,522/0,819		0,198/0,188/0,153	
	0,520/0,443/0,397		0,716/0,697/0,369		0,174/0,154/0,153	
12	0,396/0,328/0,254	0,274	1,046/0,313/0,249	0,395	0,331/0,287/0,305	0,299
	0,272/0,312/0,244		0,267/0,408/0,309		0,222/0,305/0,329	
	0,231/0,188/0,246		0,294/0,272/0,401		0,286/0,297/0,337	
13	0,152/0,188/0,227	0,161	0,265/0,210/0,186	0,210	0,312/0,314/0,367	0,275
	0,140/0,119/0,158		0,176/0,350/0,130		0,255/0,267/0,211	
	0,166/0,144/0,155		0,186/0,217/0,170		0,215/0,223/0,317	
14	0,143/0,194/0,151	0,140	0,235/0,282/0,204	0,298	0,705/1,336/1,743	1,109
	0,141/0,165/0,115		0,265/0,317/0,208		0,994/1,036/0,953	
	0,104/0,132/0,116		0,700/0,248/0,229		0,482/1,808/0,930	
15	0,597/0,413/0,404	0,407	2,950/1,261/0,722	1,015	0,291/0,411/0,252	0,297
	0,435/0,323/0,415		0,922/0,678/0,780		0,426/0,228/0,319	
	0,379/0,335/0,367		0,618/0,527/0,685		0,245/0,265/0,242	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası



Çizelge 4.9. (Devam) Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinde TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat No	24*	Ort.	48*	Ort.	72*	Ort.
<b><i>L. mono.</i></b> <b>(ATCC)</b>	4,000/2,460/2,613	2,832	4,000/3,264/2,045	2,482	1,244/0,914/0,928	0,926
	2,522/2,495/2,760		2,152/2,058/2,025		0,805/0,893/0,867	
	3,178/2,529/2,936		1,923/1,897/2,979		0,903/0,946/0,838	
<b><i>L. innocua</i></b> <b>(ATCC)</b>	0,319/0,317/0,185	0,311	0,434/0,276/0,581	0,387	0,139/0,118/0,123	0,132
	0,266/0,305/0,337		0,522/0,424/0,385		0,105/0,124/0,138	
	0,337/0,366/0,375		0,300/0,251/0,311		0,118/0,163/0,160	
<b>Kontrol</b>	0,097/0,091/0,081	0,084	0,079/0,079/0,097	0,089	0,084/0,085/0,087	0,086
	0,080/0,074/0,085		0,089/0,089/0,102		0,087/0,085/0,089	

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

*L. mono.*: *L. monocytogenes*

Çizelge 4.10. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen toplam 15 *Listeria* izolatının TSB+% 1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

İzolat no.	24*	48*	72
1	++	+++	++
2	++	++	+
3	++	++	+
4	++	++	+
5	++	++	+
6	++	++	+
7	++	+++	++
8	++	++	+
9	++	++	+
10	+++	+++	+
11	+++	+++	+
12	++	+++	++
13	+	++	++
14	+	++	+++
15	+++	+++	+

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin tutunma dereceleri TSB+ % 1 glikoz'daki negatif kontrollerin ortalamasına göre değerlendirilmiştir. Derecelendirmede kullanılan her bir aralık negatif kontrolün sırayla bir, iki ve dört katı olacak şekilde belirlenmiştir. Buna göre; 24, 48 ve 72 saatlik süre sonunda TSB+% 1 glikoz'daki tutunma dereceleri:

a. 24 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,084  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,168  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,336  $\leq$  İyi (+++) ....

b. 48 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,089  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,178  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,356  $\leq$  İyi (+++) ....

c. 72 saat: .... Negatif (-)  $\leq$  0,086  $\leq$  Zayıf (+)  $\leq$  0,172  $\leq$  Orta (++)  $\leq$  0,344  $\leq$  İyi (+++) ....

Çizelge 4.11. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 *Listeria* türünün 30 °C’de TSB’de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> N=7			<i>L. grayi</i> n=1			<i>L. welshimeri</i> n=1		
	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(++)	(+)
24*	6	1	-	-	1	-	1	-	-
48*	3	3	1	-	1	-	-	1	-
72*	-	1	6	-	-	1	-	-	1

Çizelge 4.12. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C’de TSB’de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdeleri

<i>Listeria</i> spp.	TSB					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%14,28	Zayıf Pozitif (+)	%85,71
	Orta der. Pozitif (++)	%14,28	Orta der. Pozitif (++)	%42,85	Orta der. Pozitif (++)	%14,28
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%85,71	Kuvvetli Pozitif (+++)	%42,85	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%100
	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. welshimeri</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%100
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%100	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türleri 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunmaları farklılık göstermektedir. 24 saat sonunda 6 (% 85,71) *L. innocua* ve bir (% 100) *L. welshimeri*'nin (+++) iyi; bir'er (% 14,28) *L. innocua* ve (% 100) *L. grayi* izolatının ise (++) orta derecede tutunma gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türlerin aynı ortamda 48 saat sonunda tutunma derecelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Buna göre; 3 (% 42,85) *L. innocua* (+++) iyi; 3 (% 42,85) *L. innocua*, bir'er (% 100) *L. grayi* ve (% 100) *L. welshimeri* izolatı (++) orta; bir (% 14,28) *L. innocua* izolatı ise (+) zayıf derecede tutunma gösterdiği bulunmuştur. Aynı türler aynı ortamda 72 saat sonunda, 24 saate göre tam ters özellikte biyofilm oluşturmasıyla dikkati çekmiştir. Buna göre; sadece bir (% 14,28) *L. innocua* izolatı (++) orta derecede tutunma gösterirken izolatların çoğunda (6 *L. innocua*, 1 *L. grayi*, 1 *L. welshimeri*) (+) zayıf tutunma görülmüştür (Çizelge 4.11., 4.12.).

Çizelge 4.13. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 *Listeria* türünün 30 °C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> n=4			<i>L. grayi</i> N=2		
	+++	++	+	+++	++	+
24*	1	2	1	1	1	-
48*	1	1	2	1	1	-
72*	1	1	2	-	1	1

Çizelge 4.14. Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C'de TSB'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi

<i>Listeria</i> <i>spp.</i>	TSB					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	%25	Zayıf Pozitif (+)	%50	Zayıf Pozitif (+)	%50
	Orta der. Pozitif (++)	%50	Orta der. Pozitif (++)	%25	Orta der. Pozitif (++)	%25
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%25	Kuvvetli Pozitif (+++)	%25	Kuvvetli Pozitif (+++)	%25
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%50
	Orta der. Pozitif (++)	%50	Orta der. Pozitif (++)	%50	Orta der. Pozitif (++)	%50
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%50	Kuvvetli Pozitif (+++)	%50	Kuvvetli Pozitif (+++)	-

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunmaları incelendiğinde; 24 saat sonunda bir'er (% 25) *L. innocua* ve (%50) *L. grayi* izolatu (+++) iyi; 2 (% 50) *L. innocua* ve (% 50) 1 *L. grayi* orta (++); bir (% 25) *L. innocua* izolatu ise zayıf (+) derecede biyofilm oluşturmuştur. Bu türlerin aynı ortamda 48 saat sonundaki tutunmalarında ise *L. innocua*'da azalma görülürken (1'i (+++) iyi; 1'i (++) orta ve 2'si (+) zayıf) *L. grayi*'de bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı türlerin aynı ortamda 72 saat sonunda, 24 saate göre tam ters özellikte biyofilm oluşturmasıyla dikkati çekmiştir. Buna göre; sadece bir (% 25) *L. innocua* izolatu (+++) iyi; bir'er (% 25) *L. innocua* ve (% 50) *L. grayi* (++) orta; 2 (% 50) *L. innocua*, 1 (% 50) *L. grayi* (+) zayıf derecede tutunma göstermiştir (Çizelge 4.13., 4.14.).

Çizelge 4.15. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 *Listeria* türünün 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> n=7			<i>L. grayi</i> n=1			<i>L. welshimeri</i> n=1		
	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
24*	2	4	1	-	1	-	1	-	-
48*	2	4	1	-	1	-	-	1	-
72*	-	1	6	-	-	1	-	-	1

Çizelge 4.16. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi

<i>Listeria</i> spp.	TSB+%1 NaCl					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	%14,28	Zayıf Pozitif (+)	%14,28	Zayıf Pozitif (+)	%85,71
	Orta der. Pozitif (++)	%57,14	Orta der. Pozitif (++)	%57,14	Orta der. Pozitif (++)	%14,28
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%28,57	Kuvvetli Pozitif (+++)	%28,57	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%100
	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. welshimeri</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	%100
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	%100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	%100	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 24 saat sonundaki tutunmaları incelendiğinde; 2 (% 28,57) *L. innocua* ve bir (% 100) *L. welshimeri*'nin (+++) iyi; 4 (% 57,14) *L. innocua* ve bir (% 100) *L. grayi* (++) orta; bir (% 14,28) *L. innocua* izolatının ise (+) zayıf derecede biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Aynı türlerin aynı ortamda 48 saat sonrası tutunma dereceleri değerlendirildiğinde; *L. innocua* ve *L. grayi* izolatlarının 24 saatteki tutunmalarına benzer sonuçlar alınırken *L. welshimeri*'nin tutunması (++) orta dereceye düşmüştür. Aynı türler aynı ortamda 72 saat sonunda, 24 saate göre tam ters özellikte biyofilm oluşturmasıyla dikkati çekmiştir. Buna göre; sadece bir (% 14,28) *L. innocua* izolatı (++) orta derecede tutunma gösterirken izolatların çoğunda (6 *L. innocua*, 1 *L. grayi*, 1 *L. welshimeri*) (+) zayıf tutunma görülmüştür (Çizelge 4.15., 4.16).



Çizelge 4.17. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 *Listeria* türünün 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> n=4			<i>L. grayi</i> N=2		
	+++	++	+	+++	++	+
24*	1	3	-	1	-	1
48*	1	1	2	1	-	1
72*	1	1	2	1	-	1

Çizelge 4.18. Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C'de TSB+%1 NaCl'de 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi

<i>Listeria spp.</i>	TSB+%1 NaCl					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 50	Zayıf Pozitif (+)	% 50
	Orta der. Pozitif (++)	% 75	Orta der. Pozitif (++)	% 25	Orta der. Pozitif (++)	% 25
	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 25	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 25	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 25
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	% 50	Zayıf Pozitif (+)	% 50	Zayıf Pozitif (+)	% 50
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunmaları incelendiğinde; 24 saat sonunda bir'er (% 25) *L. innocua* ve (% 100) *L. grayi* izolatu (+++)'yi; 3 (% 75) *L. innocua* izolatu (++) orta; 1 (% 50) *L. grayi* izolatu ise (+) zayıf derecede biyofilm oluşturmuştur. Aynı türlerin aynı ortamda 48 saat sonundaki tutunmalarında ise *L. innocua*'da azalma görülürken (1'i (+++) iyi; 1'i (++) orta ve 2'si (+) zayıf) *L. grayi*'de bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı ortamda 72 saat sonunda ise sadece bir'er (% 25) *L. innocua* izolatu (++) iyi ve (++) orta; 2 (% 50) *L. innocua* (+) zayıf derecede tutunurken; *L. grayi*'de yine değişiklik gözlenmemiş olup diğer süreler ile (24 ve 48 saat) aynı tutunmayı göstermiştir (Çizelge 4.17., 4.18.).

Çizelge 4.19. Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 9 *Listeria* türünün 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> n=7			<i>L. grayi</i> n=1			<i>L. welshimeri</i> n=1		
	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
24*	-	7	-	-	1	-	-	1	-
48*	2	5	-	-	1	-	-	1	-
72*	-	2	5	-	-	1	-	-	1

Çizelge 4.20. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi

<i>Listeria</i> spp.	TSB+%1 glikoz					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 71,42
	Orta der. Pozitif (++)	% 100	Orta der. Pozitif (++)	% 71,42	Orta der. Pozitif (++)	% 28,57
	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 28,57	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 100
	Orta der. Pozitif (++)	% 100	Orta der. Pozitif (++)	% 100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. welshimeri</i>	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 100
	Orta der. Pozitif (++)	% 100	Orta der. Pozitif (++)	% 100	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-	Kuvvetli Pozitif (+++)	-

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 24 saat sonundaki tutunmaları incelendiğinde; izolatların tamamı (% 100) (7 *L. innocua*, 1 *L. grayi* ve 1 *L. welshimeri*) (++) orta derecede biyofilm oluşturmuştur. Bu türlerin aynı ortamda 48 saat sonra tutunma dereceleri değerlendirildiğinde; sadece 2 (% 28,57) *L. innocua* suşu (+++) iyi derecede tutunurken, 5 (% 71,42) *L. innocua*, bir'er (% 100) *L. grayi* ve *L. welshimeri* izolatu (++) orta kuvvette biyofilm oluşturmuştur. Aynı türlerin aynı ortamda 72 saat sonrasında oluşturdukları biyofilm, 24 saate göre azalması ile dikkati çekmiştir. Buna göre; 2 (% 28,57) *L. innocua* izolatu (++) orta derecede tutunma gösterirken diğer izolatlarda (5 *L. innocua*, 1 *L. grayi*, 1 *L. welshimeri*) (+) zayıf tutunma görülmüştür (Çizelge 4.19., 4.20.).

Çizelge 4.21. Peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 *Listeria* türünün 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

Süre	<i>L. innocua</i> n=4			<i>L. grayi</i> N=2		
	+++	++	+	+++	++	+
24*	2	1	1	1	-	1
48*	3	1	-	1	1	-
72*	-	2	2	1	-	1

Çizelge 4.22. Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 30 °C'de TSB+%1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma yüzdesi

<i>Listeria spp.</i>	TSB+%1 glikoz					
	24*		48*		72*	
<i>L. innocua</i>	Zayıf Pozitif (+)	% 25	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 50
	Orta der. Pozitif (++)	% 25	Orta der. Pozitif (++)	% 25	Orta der. Pozitif (++)	% 50
	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 75	Kuvvetli Pozitif (+++)	-
<i>L. grayi</i>	Zayıf Pozitif (+)	% 50	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 50
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	% 50	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50	Kuvvetli Pozitif (+++)	% 50

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

n=Toplam izolat sayısı

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

Not: Yüzde değerleri çalışılan her tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunmaları incelendiğinde; 24 saat sonunda 2 (% 50) *L. innocua* ve bir (%50) *L. grayi* izolatu (+++)'yi; sadece bir (% 25) *L. innocua* izolatu (++) orta; bir'er (% 25) *L. innocua* ve (% 50) *L. grayi* suşu ise (+) zayıf derecede biyofilm oluşturmuştur. Yine aynı ortamda 48 saat sonundaki tutunmada *L. innocua* (3'ü (+++) iyi; 1'i (++) orta)'da ve *L. grayi*'de (1'i (+++) iyi; 1'i (++) orta) artış olduğu tespit edilmiştir. Aynı türlerin aynı ortamda 72 saat sonunda ki biyofilm oluşumuna bakıldığında ise, 1 (% 50) *L. grayi* izolatının (+++) iyi; 2 (% 50) *L. innocua*'nın (++) orta; 2 (% 50) *L. innocua* ve 1 (% 50) *L. grayi*'nin (+) zayıf tutunduğu bulunmuştur (Çizelge 4.21., 4.22.).

Çizelge 4.23. *L. monocytogenes* (ATCC 19114) ve *L. innocua* (ATCC 33090) suşlarının 30 °C'de TSB, TSB+%1 NaCl ve TSB+% 1 glikoz'da 24, 48 ve 72 saat sonundaki tutunma dereceleri

No	Suş isimleri	TSB			TSB+%1 NaCl			TSB+%1 glikoz		
		24*	48*	72*	24*	48*	72*	24*	48*	72*
1.	<i>L. mono.</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2.	<i>L. innocua</i>	+++	++	+	++	+++	+	++	+++	+

24\*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48\*: 48 saatlik inkübasyon sonrası, 72\*: 72 saatlik inkübasyon sonrası

\*(-); negatif, \*(+); zayıf, \*(++); orta, \*(+++); iyi/kuvvetli

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Süt içerdiği çok çeşitli besin maddelerinden dolayı tüm memeli canlılarda organizmanın ihtiyacını karşılayabilen temel gıdadır. Bu sebeple mikroorganizmalar için de çok iyi bir besi ortamıdır. Çiğ sütün yüksek sayıda bakteri içermesi kontaminasyonu gösterir. Memenin kirli veya hayvanın hasta olması halinde kontaminasyon daha fazla oranda gerçekleşir. Bu özelliğinden ötürü çiğ süt, mikroorganizma kaynaklı çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında potansiyel bir ortamıdır. Peynirin kalitesinde de en önemli faktörlerden biri çiğ sütün mikroflorasıdır. Halk sağlığı açısından güvenilir, kaliteli peynir üretilebilmesi için çiğ sütlerin pastörize edilmesi zorunludur. Ancak yetersiz pastörizasyon ve olgunlaşma sürecindeki bakteriyel kontaminasyon peynir üretiminde de istenmeyen mikroorganizmaları bulundurur [Kaya, 2002; Ulusoy, 2004].

Son yıllarda, Dünya Sağlık Örgütü (2000) tarafından yapılan incelemelerde *L. monocytogenes*'in neden olduğu listeriozisin zoonoz kökenli bir hastalık olmasına rağmen, insanlara gıdalar vasıtasıyla geçtiği belirtilmiştir. Bu konuda yapılan araştırmalarda *L. monocytogenes*'in kontaminasyonunu sağlayan gıdalar arasında en fazla süt ve süt ürünleri gösterilmektedir [Koçan ve Halkman, 2006].

Süt işletmelerinde relatif rutubetin yüksek olması nedeniyle *L. monocytogenes* kökenli biyofilmler en çok taşıma hattı ve gider kanallarında görülmektedir. Buna ilaveten süt proteinlerinin besleyici özelliği ve süt yağının koruyucu etkisi ile etken mikroorganizma süt hücreleri içinde yer alarak oluşturduğu biyofilm halk sağlığını ciddi olarak tehdit etmektedir [Koluman, 2007].

*Listeria*'lar çevre şartlarına geniş tolerans göstererek yaşayan mikroorganizmalar olup özellikle gıdalardaki kontaminasyonu önemlidir. Kontaminasyon kaynağı olarak en fazla süt ve süt ürünleri dikkati çekerken aynı zamanda deniz ürünleri, et ve grubu ürünler ile taze gıdalardan da izole edilebilmektedir. Bu nedenle gıda üretiminin yapıldığı ortamlarda *Listeria*'ların biyofilm oluşturmaları oldukça önemlidir. Tüm bu özellikleri nedeniyle son yıllarda bu mikroorganizma dikkatleri üzerine çekmiş ve

potansiyel kaynakları araştırılmaya başlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, çiğ süt ve peynir örneklerinden izole ettiğimiz *Listeria* türlerinin biyofilm oluşturmaları incelenmiştir.

Bu amaçla, analiz edilen 80 çiğ süt örneğinin 9'unda (% 11,25) *Listeria* izolatu saptanmıştır. Bu *Listeria* türlerinin 7'si (%8,75) *L. innocua*, 1'i (%1,25) *L. welchimeri*, 1'i (%1,25) de *L. grayi* olarak tanımlanmıştır. Analiz edilen 80 peynir örneğinde ise; 4'ü *L. innocua* (%5), 2'si *L. grayi* (%2,5) olmak üzere toplam 6 (% 7,5) *Listeria* spp. izole edilmiştir, (Bkz. Çizelge 4.1, Çizelge 4.3).

Rahimi ve arkadaşları (2010) İran'da yaptıkları çalışmada 594 çiğ süt ve süt ürünü numunesinden 55 (%9,3) örneğin *Listeria* spp. pozitif olduğunu bildirmişlerdir. *Listeria*'ların en yaygın bulunduğu kaynağı, koyun çiğ süt örnekleri (%22,6) ve bunu takiben peynir örnekleri (%18,9) olarak belirtmişlerdir. Ayrıca en çok elde edilen izolatu *L. innocua* (%58,2) ve devamında ise *L. monocytogenes* (%32,7) ile *L. seeligeri* olarak tespit etmişlerdir [Rahimi ve ark., 2010]. Bu çalışmada 80 çiğ süt ve 80 peynir olmak üzere 160 örneğinden 15 (% 9,37) örneğin *Listeria* spp. pozitif olduğu bulunmuştur. Ayrıca en çok elde edilen izolatu *L. innocua* (% 73,3) ve devamında ise *L. grayi* (%20) ile *L. welshimeri* (% 6,6) olarak tespit edilmiştir.

Pesavento ve arkadaşları (2010) İtalya'da *Listeria* spp.'nin perakende tüketime sunulan gıdalardaki bulunma sıklığını analiz etmek için yapmış oldukları bir çalışmada inceledikleri 258 taze yumuşak peynirin 9'unda (%3,5) *Listeria* spp. tespit etmişlerdir. Elde edilen 10 izolat; 2'si *L. monocytogenes*, 6'sı *L. innocua* ve birer *L. welshimeri* ve *L. grayi* olarak tanımlanmıştır [Pesavento ve ark., 2010].

Frece ve arkadaşları (2009) Hırvatistan'ın Zagreb şehrinde yapmış oldukları çalışmada çiğ süt ve taze peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. İnceledikleri 180 adet çiğ süt ve peynir örneğinde % 21,3 düzeyinde *Listeria* izolatına rastlamışlardır [Frece ve ark., 2009]. Bu çalışmada ise, 160 adet çiğ süt ve peynir örneğinde % 9,37 düzeyinde izolatı bulunmuştur.



Rudolf ve Scherer (2001) Avrupa ülkelerine ait inceledikleri çeşitli 374 peynir örneğinde % 6,4 oranında *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir [Rudolf ve Scherer, 2001]. Bu çalışmada 80 adet peynirin 6'sında (%7,5) *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Elde edilen 6 izolatın 4'ü *L. innocua*, 2'si *L. grayi* olarak tanımlanmıştır.

Menendez ve arkadaşları (2001) İspanya'da keçi sütünden yapılmış 24 peynir örneğinin 2 tanesinde *L. monocytogenes* bulmuşlardır [Menendez ve ark., 2001]. Solano-Lopez ve arkadaşları (2000) deneysel olarak yaptıkları bir çalışmada Meksika tipi Manchego peynirlerinde 5 günlük ve Chihuahua peynirlerinde 6 haftalık olgunlaşma periyodu sonunda, *L. monocytogenes*'in canlı kalabildiğini tespit etmişler, Chihuahua peynirlerinde 6 hafta sonunda *L. monocytogenes* sayısında bir miktar düşme olmasına rağmen, hala önemli düzeyde etkenin bulunduğunu, Meksika tipi Manchego peynirinde ise çok fazla bir değişme olmadığını bildirmişlerdir [Solano-Lopez ve ark., 2000].

Ülkemizde bu konuda yapılan araştırmalarda ise; Akkaya ve Alişarlı (2006) Afyonkarahisar iline yönelik yaptıkları çalışmada inceledikleri 100 adet beyaz peynir örneğinde *L. monocytogenes* varlığını araştırmıştır. % 6'sında (6/100) *L. monocytogenes* tespit edilmiştir [Akkaya ve Alişarlı, 2006].

Uysal ve Anđ (2003) İstanbul, Trakya ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan 271 peynir, 221 süt, 11 lor, 8 tereyağı olmak üzere 511 örnekte *Listeria* spp. varlığını araştırmış, peynir örneklerinden 11 *L. monocytogenes* (% 4), bir *L. grayi* (% 0,36); çiğ süt (% 0,45) ve tereyağı (% 12) örneklerinden birer *L. monocytogenes* suşu izole etmişlerdir [Uysal ve Anđ, 2003].

Gülmez ve Güven (2001) Kars ilinde yapmış oldukları çalışmada 40 adet taze peynir örneğinin 6 (%15)'sında *Listeria* türlerinin varlığını tespit etmişler bu örneklerin 2 (%5)'sinde *L. monocytogenes*, 2 (%5)'sinde *L. innocua* ve 2 (%5)'sinde ise hem *L. monocytogenes* hem de *L. innocua* tespit edilmiştir [Gülmez ve Güven, 2001]. Bizim araştırmamızda peynir örneklerinde *L. monocytogenes*'e hiç rastlanılmamışken 80

adet peynir örneğinin 6 (%7,5)'sında *Listeria* türleri bulunmuştur. Bu örneklerin 4 (%5) 'ü *L. innocua*, 2 (%2,5)'si *L. grayi* olarak bulunmuştur.

Sağun ve arkadaşları (2001) Van ve yöresindeki 250 adet çiğ süt ve 254 adet otlu peynirlerde yaptıkları çalışmada süt örneklerinden 6'sı (%2,4) *Listeria* yönünden pozitif bulunmuş olup izolatların 3'ü *L. monocytogenes* (%1,2), 1'i *L. innocua* (%0,4) ve 1'i de *L. welshimeri* (%0,4) olarak tanımlanmıştır. Otlu peynir örneklerinden ise 13'ü (%5,11) *Listeria* yönünden pozitif bulunurken izole edilen suşların 10'u *L. monocytogenes* (%3,93), 1'i *L. ivanovii* (%0,39), 1'i *L. innocua* (%0,39) ve 1'i de *L. welshimeri* (%0,39) şeklinde belirtilmiştir [Sağun ve ark., 2001].

Bu çalışmada, 80 çiğ süt örneğinin 9'unda (% 11,25) *Listeria* izolatı saptanmıştır. Bu *Listeria* türlerinin 7' si (%8,75) *L. innocua*, 1'i (%1,25) *L. welshimeri*, 1'i (%1,25) de *L. grayi* olarak tanımlanmıştır. 80 peynir örneğinin ise 6'sı (% 7,5) *Listeria* türleri ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların; 4'ü *L. innocua* (%5), 2'si *L. grayi* (%2,5) olarak bulunmuştur.

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur [Post ve ark., 2002]. Biyofilm aynı zamanda yüzeye tutunmuş olan mikroorganizmaların, besin düzeyi düşük olan çevrelerde besin akışını sağlayıp, bakterilerin hayatta kalma ve gelişim gösterme oranını artırarak bakteriye avantaj sağlar. [Szewzyk ve ark., 2000]. Bu konuda yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur [Davey ve O'toole, 2000].

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir [Deighton ve ark., 2001; Arciola ve ark., 2002; Harraghy ve ark., 2006]. Bu yöntemlerden; tüp testi [Mathur ve ark., 2006] , mikroplate testi [Stepanovic, 2000], radiolabeling

mikroskopi [Deighton ve ark., 2001] ve Congo Red Agar testi [Arciola ve ark., 2002] gibi testler biyofilm tayini için kullanılmaktadır. Fakat mikroplate metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır [Stepanovic ve ark., 2007].

Bu araştırmada, mikroplate ile yapılan biyofilm çalışmasında tutunma farklılıklarını incelemek amacıyla izolatların her biri için üç farklı sıvı ortamı (TSB, TSB+% 1 NaCl, TSB+% 1 glikoz) ve üç farklı inkübasyon süresi ile (24 saat, 48 saat, 72 saat) 9 kez tekrarlanarak çalışılmıştır. Biyofilm oluşumunun ölçülmesi için 96 kuyucuklu plastik mikroplate kullanılmıştır.

Bu araştırmada çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.11.'de görüldüğü gibi, bütün türlerde (*L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*) en iyi tutunmanın 24 ve 48 saatte olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı ortamda 72 saat sonra tutunmada azalma olduğu dikkati çekmiştir.

Bu araştırmada peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.13.'te belirtildiği gibi, en iyi tutunmanın 24 saat sonra olduğu tespit edilmiştir. *L. innocua*'da 48 ve 72 saat sonra tutunmanın zayıfladığı gözlenmiş, *L. grayi*'de tutunmanın 24 ve 48 saatte aynı iken 72 saat sonra azaldığı bulunmuştur.

Harvey ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada, TSB'de üretilen çevresel, hayvansal, gıda ve klinik kökenli *L. monocytogenes* suşlarının mikroplate yöntemi ile biyofilm oluşumunu incelemişlerdir. TSB'de 20 °C'de 48 saat bekletilen 138 *L. monocytogenes* suşunun % 92'sinin zayıf; % 6,5'nin orta; % 1,5'nin ise kuvvetli olarak biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir [Harvey ve ark., 2007]. Bu çalışmada ise, çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB'de 30 °C'de 48 saatlik tutunmalarında, *L. innocua*'nın %42,8'nin kuvvetli; %42,8'nin orta, %14,2'sinin zayıf derecede biyofilm oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada kullanılan *L. innocua* ATCC 33090 suşunun TSB'de 30 °C'deki en iyi tutunmanın

24 saatte olduğu bulunmuştur. Aynı ortamda aynı suşun oluşturduğu biyofilm, 48 saat sonra orta (++) , 72 saat sonra ise zayıf (+) dereceye düşmüştür.

Djordjevic ve arkadaşları (2002) yaptıkları bir çalışmada, *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu mikroplate yöntemi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, standardize olmuş polyvinyil klorid mikroplateleri (PVC) kullanarak *L. monocytogenes* suşlarının tutunmalarını kıyaslamışlardır. Toplam 31 *L. monocytogenes* suşunu plate kuyularında bulunan Welshimer's brothta 32 °C'de 20 ve 40 saatte üretmişlerdir. PVC mikroplate ile suşların daha hızlı ve basit olarak biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir [Djordjevic ve ark., 2002].

Stepanovic ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada, 48 *L. monocytogenes* suşunun plastik yüzeydeki tutunmalarını araştırmışlardır. Kültür ortamı olarak Brain Heart Infusion Broth (BHI), Trycase Soy Broth (TSB), Meat Broth (MB) ve 1/20 dilüe edilmiş TSB kullanılmıştır. BHI, TSA ve MB'nin *L. monocytogenes*'de en iyi biyofilm üreten ortamlar iken dilüe TSB'nin en az biyofilm üreten ortam olduğu bulunmuştur [Stepanovic ve ark., 2004]. Bu çalışmada da, *Listeria* izolatlarını üretmek için temel besi ortamı olarak TSB kullanılmış, ayrıca TSB'ye glikoz (%1) ve NaCl (%1) eklenip farklı inkübasyon süreleri uygulanarak tutunma dereceleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.15.'te belirtildiği gibi, *L. innocua* (2 izolat kuvvetli, 4 izolat orta, 1 izolat zayıf) ve *L. grayi* (1 izolat orta)'de tutunma 24, 48 saat sonunda aynı kalırken 72 saat sonunda azaldığı (1 *L. innocua* orta, 6 *L. innocua*; 1 *L. grayi* izolatı ise zayıf) gözlenmiştir. *L. welshimeri* (1 izolat kuvvetli)'de ise en iyi tutunmanın 24 saat sonunda olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB+%1 NaCl kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.17.'de belirtildiği gibi, *L. innocua*'da en iyi tutunma (1 izolat kuvvetli; 3 izolat orta) 24 saat sonra görülürken 48 ve 72 saat sonunda tutunmanın azaldığı (1 izolat kuvvetli; 1 izolat

orta; 2 izolat zayıf) bulunmuştur. *L. grayi*'de ise; 24, 48 ve 72 saatte aynı tutunma (1 izolat kuvvetli; 1 izolat zayıf) tespit edilmiştir.

Bu araştırmada çiğ süt örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.19'da belirtildiği gibi, *L. innocua*'da en iyi tutunma 24 ve 48 sonra görülürken 72 saat sonra tutunma derecesinde düşüş gözlenmiştir. Aynı durum 24 ve 48 saat sonra *L. grayi* ve *L. welshimeri*'de de gözlenmiş olup tutunma zayıf dereceye düşmüştür.

Bu araştırmada peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* türlerinin TSB+%1 glikoz kullanılarak yapılan biyofilm çalışması incelendiğinde; Çizelge 4.21'de belirtildiği gibi, *L. innocua*'da en iyi tutunma 48 saatte görülürken 24 ve 72 saat sonundaki tutunmaların 48 saate göre azaldığı dikkati çekmiştir. *L. grayi*'de ise; 24 ve 72 saat sonunda aynı tutunmalar gözlenirken 48 saat sonra azalma olduğu tespit edilmiştir. Zaman ilerledikçe tutunmalardaki bu azalmaların nedeninin biyofilm oluşturan bakterilerin yeni koloni oluşturmak için yüzeyden kopup ayrılmalarından kaynaklandığından ya da ortamdaki besin azalmasından meydana geldiğinden düşünülmektedir.

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen 15 *Listeria* izolatının 48 saatlik inkübasyon sonrasında kuvvetli derecede biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası tutunmada TSB+%1 glikoz en iyi besi ortamı olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeninin biyofilm oluşumunda bakteri hücreleri tarafından üretilen ekzopolisakkarit matriks olduğu düşünülmektedir.

Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif ya da gram negatif oluşu), bakteri sayısı, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddeleri içeriği ve miktarı, bağlandığı yüzeyin özellikleri gibi birçok faktörler ile değişebilmektedir [Gün ve Ekinci, 2009].

Adetunji ve Adegoke (2008) yaptıkları çalışmada, yumuşak peynirden izole ettikleri 40 *L. monocytogenes* suşunun biyofilm oluşumunu ve fabrikadaki cam yüzeyler üzerine tutunmalarını değerlendirmişlerdir. Çalışmada kristal viyole binding yöntemini kullanmışlardır. Bu suşlarda 24 saatte tutunma görülmezken, 48 ve 72 saat içerisinde suşların yarısında tutunma bulunmuştur [Adetunji ve Adegoke, 2008].

Mai ve Conner (2007) yaptıkları çalışmada, zenginleştirilmiş (BHI) ve minimal ortamda *L. monocytogenes* ATCC 19111 suşunun 4 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C ve 42 °C'deki tutunmalarını araştırmışlardır. *L. monocytogenes* minimal ortamda üretildiğinde; 42 °C haricindeki sıcaklık değerlerinin artması ile tutunma sayısı artmıştır. Zenginleştirilmiş ortam kullanıldığında ise; tutunan hücrelerin sayısı 42 °C'de 30 °C ve 37 °C'ye göre daha az bulunmuştur [Mai ve Conner, 2007].

Koluman (2006), *Listeria monocytogenes*'i hem paslanmaz çelik yüzeylere hem de Buna-N maddesinden yapılmış plastik contalara yapıştırarak biyofilm oluşumunu incelemiştir. Sonuçta Buna-N maddesinin diğer plastiklerden farklı olarak *Listeria monocytogenes* tutunmasını inhibe ettiği, diğer plastiklerin ise böyle bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Süt kalıntısının en çok boru dirsekleri, ek yerleri ve contalarda olduğu düşünülerek; kalıntı miktarı, sıcaklık (6°C-25°C), nisbi rutubet (%32,5-75,5) değişkenleri ile *L. monocytogenes*'in yapışma miktarı arasında bir bağlantı kurulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda süt kalıntısı çok azken bile, 6°C ve % 75,5 nisbi rutubet koşullarında, 10 gün sonra contalardan ve paslanmaz çelik borulardan *L. monocytogenes* izole edilebilmiştir. Daha fazla kalıntı varlığında ve en kötü sıcaklık ve rutubet koşullarında ise en az 3, en fazla 5 gün *L. monocytogenes*'in canlılığını koruduğu ortaya konmuştur. Süt kalıntısının, bakteri için tutunmayı sağladığı ve besin kaynağı olduğu bildirilmiştir. Bu mikroorganizmaların 25°C'de %75,5 nisbi rutubette paslanmaz çelik yüzeye tutunup gelişebildiği, ancak Buna-N yapısındaki contalara tutunmasının mümkün olmadığı, bu bölgede biriken süt kalıntılarına yapışabileceği bildirilmiştir [Koluman, 2006].

Biyofilmler sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle gıda sanayisinde oldukça önemlidir. Boru hatlarında oluşan biyofilm boru hattı boyunca akışın azalmasına

neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir [Gün ve Ekinci, 2009].

Chae ve Schraft (2000) yaptıkları çalışmada, inkübasyondan 3 saat sonra 13 *L. monocytogenes* suşunun hepsinin cam yüzeye yapıştığını ve biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir [Chae ve Schraft, 2000].

Sonuçta, yapılan bu çalışma ile insanlar ve hayvanlar için önemli bir cins olan *Listeria*'ların plastik yüzeylerdeki tutunmalarından ötürü su arıtma ve gıda işletim sistemlerindeki önemi dikkate alınarak daha fazla çalışma yapılması gerektiği ortaya konulmuştur.

## KAYNAKLAR

Adetunji, V.O., Adegoke, G.O., “Formation of biofilm by strains of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese ‘wara’ and its processing environment”, *African Journal of Biotechnology*, 7 (16): 2893-2897 (2008).

Akkaya, L., Alişarlı, M., “Afyonkarahisar’da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17 (1-2): 87-91 (2006).

Allison, D.G., Sutherland, I.W., “The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria”, *Journal of General Microbiology*, 133: 1319-1327 (1987).

Anderson, A., Rognner, U., Granum, P.E., “What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?”, *International Journal of Food Microbiology*, 28(6): 145-155 (1999).

Antognoli, M.C., Lombard, J.E., Wagner, B.A., McCluskey, B.J., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., “Risk factors associated with the presence of viable *Listeria monocytogenes* in bulk tank milk from US dairies”, *Zoonoses and Public Health*, 56: 77–83 (2009).

Archer, D.L., “Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations”, *Trends in Food Science and Technology*, 7: 91-95 (1996).

Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati M., Donati, E., Montanaro, L., “Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus”, *Biomaterials*, 23: 4233-4239 (2002).

Bahk, J., Marth, E.H., “Listeriosis and *Listeria monocytogenes*”, *Foodborne Diseases*, D. E, Cliver, Madison Wilconsin, 248-255 (1990).

Bannister, B.A., “*Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese”, *Journal of Infections*, 15: 165-168 (1987).

Beumer, R.R., Hazeleger, W.C., “*Listeria monocytogenes*: diagnostic problems”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35: 191-197 (2003).

Beumer, R.R., te Giffel, M.C., Cox, L.J., “Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)- a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*”, *Letters in Applied Microbiology*, 24: 421-425 (1997).

Beverly, R.L., “The control, survival, and growth of *Listeria monocytogenes* on food products”, Ph. D thesis, *Graduate Faculty of the Louisiana State University*, USA, 126 (2004).



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

Bille, J., “*Listeria ve Erysipelothrix*”, Klinik Mikrobiyoloji, 1, *Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.*, Ankara, 474-475 (2009).

Bunce, C., Wheeler, L., Reed, G., Musser, J., Barg, N., “Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci.”, *Infection and Immunity*, 60: 2636-40 (1992).

Chae, M.S., Schraft, H., “Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains”, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 103-111 (2000).

Characklis, W.G., “Fouling biofilm development: A process analysis”, *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1923-1960 (1981).

Characklis, W.G., Marshall, K.C.,” Biofilms”, *John Wiley*, New York, USA, 523-84 (1990).

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

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., “Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces”, *Infection and Immunity*, 37:318–26 (1982).

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

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

Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., “How bacteria stick.”, *Scientific American*, 238:86-95 (1978).

Costerton, J.W., Lappin-Scott, H.M., “Introduction to microbial biofilms”, In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton, Microbial biofilms, *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom, 1-11 (1995).

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott H.M., “Microbial biofilms”, *Annual Reviews of Microbiology*, 49: 711-45 (1995).

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., “Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections”, *Science*, 284 (5418): 1318–1322 (1999).

Coşkun, S., “Beyaz Peynirde 90 Gün Olgunlaşma Süresi Boyunca *Listeria Monocytogenes* Varlığı”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 22 (2006).

Cotter, P.D., Gaban, C.G.M., Hill, C., “Analysis of the role of *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response”, *International Journal of Food Microbiology*, 60: 137-146 (2000).

Criado, M.T., Suarez, B., Ferreiros, C. M., “The importance of bacterial adhesion in the dairy industry”, *Food Technology*, 48:123-126 (1994).

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

Çiftci, Z., “Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü”, Uzmanlık Tezi, *İstanbul Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, 26-30 (2005).

Daştan, M., “Kitosan bazlı biyomalzemelerde biyofilm oluşumu mekanizmasının ve enzimatik bozunma kinetiğinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 3-10 (2006).

Davey, M.E., O’Toole, G.A., “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics”, *Micobiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867 (2000).

Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewski, E., Van Nguyen, T., “Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*”, *Methods in Enzymology*, 336:177–95 (2001).

Denes, A.R., Somers, E.B., Wong, A.C.L., Denes, F.S., “Plasma-Aided Treatment of Surfaces Against Bacterial Attachment and Biofilm Deposition”, *US Patent Search*, 6,096,564 (2002).

Denes, F.S., Dong, B., Jiang, H., Manolahe, S., Somers, E.B., Wang, Y., Wong, A.L., “Plasma enhanced deposition of antibacterial layers to inhibit biofilm formation”, <http://www.wisc.edu> (erişim tarihi:12.12.2002) (1999).

Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., “Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation”, *Applied And Enviromental Microbiology*, 68 (6): 2950-2958 (2002).

Dickson, J.S., Koohmaraie, M., “Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meatsurfaces”, *Applied And Enviromental Microbiology*, 55, 832–836 (1989).

Dickson, J.S., Nettles Cutter, C., Siragusa, G.R., “Antimicrobial effects of trisodium phosphate against bacteria attached to beef tissue”, *Journal of Food Protection*, 57: 11 (1994).

Dirksen, J., Flagg, P., “Pathogenic organisms in dairy products; cause, effects and control”, *Food Science and Technology Today*, 2: 41-43 (1988).

Doğan, H.B., “*Listeria monocytogenes*”, Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, Ankara, 522 (2000).

Donlan, R.M., “Biofilms: Microbial life on surfaces”, *Emerging Infectious Diseases*, 8: 881-890 (2002).

Donlan, R.M., Costerton J.W., “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clinical Microbiology Reviews*, 15: (2) 167-93 (2002).

Doyle, M.P., “Effect of Enviromental and Processing Conditions on *Listeria monocytogenes*”, *Food Technology*, 4: 169-171 (1988).

Dunne, M.W., “Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?”, *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 155-166 (2002).

Dunsmore, D.G., Twomey W., Whittlestone, G., Morgan, H.W., “Desing and performance of systems for cleaning products contact surfaces of food equipment”, *Journal of Food Protection*, 44: 220-240 (1981).

Durack, D.T., Beeson, P.B., “Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations”, *British Journal of Experimental Pathology*, 53: 50-3 (1972).

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

Farber, J.M., Peterkin, P.I., “*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen”, *Microbiological Reviews*, 55: 476-511 (1991).

Fletcher, M., “Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance”, *Journal of Bacteriology*, 170 (5): 2027–2030 (1988).

Frece, J., Markow, K., Cvek, D., Kolarec, K., Delas, F., “Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia”, *Journal of Dairy Research*, 77: 112–116 (2010).

Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., Hirsch, A.M., “A feeling for the microorganism: structure on a small scale. Biofilm on a plant roots”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150 (1): 79-88 (2006).

Gavin, R., S. Merino, M., Altarriba, R., Canals, Shaw, J.G., Toma's, J.M., “Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp”, *Fems Microbiology Letters*, 224: 77–83 (2003).

Gray, M.L., Killinger, A.H., “*Listeria monocytogenes* and listeric infections”, *Bacteriological Reviews*, 30 (2): 309-382 (1966).

Genigeorgis, C., “Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector”, New Challenges in Meat Hygiene: Species problems in cleaning and disinfection, In: a. F. B. S. A. Burt( ed.), *European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology*, Avusturya, 29-47 (1995).

George, S.M., Lund, B.M., Brocklehursts, T.F., “The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*”, *Letters in Applied Microbiology*, 6: 153-156 (1988).

Greenwood, M.G., Roberts, D., Burden, P., “The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales”, *International Journal of Food Microbiology*, 12: 197-206 (1991).

Gönülalan, S., “Kayseri ilinde satışı sunulan dondurmaların *Listeria* spp. varlığı yönünden incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri, 26-29 (2010).

Gülmez, M., Güven, A., “Beyaz ve çeçil peynirlerinde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması”, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 72 (2): 155-161 (2001).

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

Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J., “The potential for biofilm growth in water distribution systems”, *Water Research*, 35: 4063-4071 (2001).

Hancock, I.C., “Microbial cell surface architecture. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., Rouxhet P.G. (Eds.)”, *Microbial Cell Surface Analysis*, *VCH Publishers*, Weinheim Federal Republic of Germany, 23–59 (1991).

Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N., “Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products”, *Science of the Total Environment*, 407: 4022–4027 (2009).

- Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M., Menger, M.D., Herrmann, M., “Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections”, *The International Journal of Artificial Organs*, 29: 368–78 (2006).
- Harvey, J., Keenan, K.P., Gilmour, A., “Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains”, *Food Microbiology*, 24: 380-392 (2007).
- Herald, P.J., Zottola, E.A., “Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values”, *Journal of Food Science*, 53: 1549-1562 (1988).
- Hof, H., Nichterlein, T., Kretschmar, M., “Management of listeriosis”, *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 345–357 (1997)
- Holah, J., Kearney, L.R., “Introduction to biofilms in the food industry”, In: Melo, L. F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., *Applied Sciences*, Portugal, 23 (1992).
- Hood, S.K., Zottola, E.A., “Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel”, *Journal of Food Protection*, 60: 1034-1037 (1997).
- Huang, L., “Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions”, *Journal of Food Engineering*, 90: 380–387 (2009).
- Internet: Bacterio “Listeriosis”,  
<http://bacterio.iph.fgov.be/missions/listeria>, (2012).
- Internet: Newspaper “*Listeria* symptoms”,  
<http://newspaper.li/listeria-symptoms/>, (2012).
- Internet: Mikrobiyoloji “*Listeria monocytogenes*”,  
<http://www.mikrobiyoloji.org>, (2011).
- Internet: Orlab “*Listeria monocytogenes*”,  
<http://www.orlab.com.tr>, (2012).
- Jefferson, K.K., “What drives bacteria to produce a biofilm?”, *Fems Microbiology Letters*, 236: 163-173 (2004).
- Jones, G.W., Isaacson, R.E., “Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors”, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 10: 229–260 (1983).

Kampelmacher, E.H., van Noorle Jansen, L.M., “Further studies of the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals”, **Zentralblatt für Bacteriologie Mikrobiologie und Hygiene Abt. 1. Originale A**, 221: 70-77 (1972).

Kampelmacher, E.H., van Noorle Jansen, L.M., “Stuart’s medium voor transport van material verdacht van aanwezigheid vain *Listeria monocytogenes*”, **Tijdschr Diergeneeskde**, 93: 1297-1299 (1968).

Kathariou, S., Kanenaka, R., Allen, R.D., Fok, A.K., Mizumoto, C., “Repression of Motility and Flagellin production at 37°C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*”, **Canadian Journal of Microbiology**, 41:572-577 (1995).

Kaya, D., “Çiğ süt ve pastörize sütlerden izole edilen hareketli *Aeromonas* bakterilerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 61 (2002).

Kınık, Ö., Gönç, S., Akalın, S., “Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar”, **Ege Üniversitesi Basımevi**, Bornova-İzmir, 133-135 (1998).

Koçan, D., Halkman, A.K., “*Listeria monocytogenes* & Listeriozis”, **GIDA**, 31 (3): 133-140 (2006).

Kolstad, J., Rorvik, L.M., Granum, P.E., “Characterisation of plasmids from *Listeria* spp.”, **The International Journal of Food Microbiology**, 12: 123-132 (1990).

Koluman, A., “Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi”, Ankara Üniversitesi Araştırma tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 15 (2007).

Koneman, E.W., Allen, S.D., “Color Atlas and Textbook of Diagnostic Mikrobiology 4<sup>th</sup> ed.”, **Lippincott**, Company Phladelphia, 99-102 (1992).

Kovaks, N., “Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reaction”, **Nature**, 178-703 (1956).

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

Lehtola, M.J., Torvinen, E., Kusnetsov, J., Pitkanen, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Martikainen, P.J., Wilks, S.A., Keevil, C.W., Miettinen, I.T., “Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Caliciviruses* in Drinking Water-Associated Biofilms Grown under High-Shear Turbulent Flow.”, **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 2854-2859 (2007).

Leone, S., Molinaro, A., Alfieri, F., Cafaro, V., Lanzetta, R., Donato, A., Parrilli, M., “The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly

constituted by alginate oligosaccharides”, *Carbohydrate Research*, 341: 2456-2461 (2006).

Lindsay, D., Von Holly, A., “Different Responses of Planktonic and Attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to Sanitizer Treatment”, *Journal of Food Protection*, 62: (4) 368-379 (1999).

Lovett, J., Wesley, I.V., Vandermaaton, M.J., Bradshaw, J.G., Francis, D.W., Crawford, R.G., Donnelly, C.W., Messer, J.W., “High-temperature short time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*”, *Journal of Food Protection*. 53: 734-738 (1990).

Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., “*Listeriaceae*”, Bergey’s manual of systematic bacteriology, 3, *Springer*, New York, 244 (2009).

Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Magny, P., “Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times”, *Journal of Food Protection*, 53 (9): 742–746 (1990).

Mai, T.L., Conner D.E., “Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel”, *International Journal of Food Microbiology*, 120: 282-286 (2007).

Makino, S.I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., Igimi, S., “An outbreak of food-borne Listeriosis due to cheese in Japan, during 2001”, *International Journal of Food Microbiology*, 104: 189–96 (2005).

Marshall, K.C., “Interfaces in microbial ecology”, *Harvard University Press*, Cambridge, 44-47 (1976).

Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., “Mechanisms of the initial events in the sorption and control at surfaces”, *American Society for Microbiology News*, 58: 202-207 (1971).

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., Rattan, A., “Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods”, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24: 25–9 (2006).

Mattila-Sandholm, T., Wirtanen, G., “Biofilm formation in the industry: A Review”, *Food Reviews International*, 8 (4): 573-603 (1992).

Mc Laughlin, J., Audurier, A., Taylor, A.G., “Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infection in the Britain 1967-1984 the use of serotyping and phage typing”, *Journal of General Microbiology*, 22: 367-377 (1986).

- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., “*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods”, *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33 (2004).
- Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., “Biofilms”, *Science and Technology*, In: NATO ASI Series E, Kluwer Academic Pres, Dordrecht, The Netherlands, 499-509 (1992).
- Menendez, S., Godinez, R., Centeno, J.A., Rodriquez-Otero, J.L., “Microbiological, Chemical and Biochemical Characteristics of "Tetilla" raw Cows Milk Cheese”, *Food Microbiology*, 18 (2): 151-158 (2001).
- Merck, *Microbiology Manual. Merck*, Darmstad, Germany, 407 (2000).
- Miller, R.K., Acuff, G.R., “Sodium lactate affects pathogens in cooked beef”, *Journal of Food Science*, 59: 15-19 (1994).
- Notermans, S., Dormans, J.A.M.A., Mead, G.C., “Contribuof tion of surface attachment to the establishment of micro organisms in food processing plants: A review”, *Biofouling*, 5:1–16 (1991).
- Öksüztepe, G., Güran, H.Ş., İncili, G.K., Gül, S.B., “Elazığ’da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 25: (3) 107-114 (2011).
- Önder, M., “Çiğ ve pişmiş et örneklerinden *Listeria* türlerinin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 21 (2003).
- Önder, M., “Çiğ ve pişmiş et örneklerinden *Listeria* türlerinin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 25-27 (2003).
- Patel, J.R., Sanglay, G.C., Solomon, M.B., “Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters with antimicrobials and hydrodynamic pressure processing”, *Journal of Muscle Foods*, 20: 227–241 (2009).
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook M., “MSCRAMM-mediated adherence microorganisms to host tissues”, *Annual Review of Microbiology* , 48: 585-617 (1994).
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo. Nostro, A., “Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods”, *Food Control*, 21: 708-713 (2010).



Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., “The role of biofilms in otolaryngologic infections”, *Current Opinion in Otolaryngology Head Neck Surgery*, 12 (3): 185–90, (2004).

Poulsen, L.V., “Microbial Biofilm in Food Processing”, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32: 321-326 (1999).

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

Qvist, S., Sehested, K., Zeuthen P., “Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product”, *International Journal of Food Microbiology*, 24: 283-293 (1994).

Rahimi, E., Ameri, M., Momtaz, H., “Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran, *Food Control*, 21: 1448-1452 (2010).

Reissbrodt, R., “New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.”, *International Journal of Food Microbiology*, 95: 1-9 (2004).

Rocourt, J., “The Recognition and Identification of *Listeria* Species by Classical Methods”, *Turkish Journal of Infection*, 2(4): 471 – 485 (1988).

Rocourt, J., “The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods”, *Journal of Infection*, 2 (4): 471-485 (1988).

Rudolf, M., Shereer, S., “High Incidence of *Listeria monocytogenes* in European Red Smear Cheese”, *International Journal of Food Microbiology*, 63:91-98 (2001).

Sağun, E., Sancak, Y.C., İşleyici, Ö., Ekici, K., “Van ve Çevresi Süt ve Otlı Peynirlerinde *Listeria* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı Üzerine Bir Araştırma”, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 25(1): 15-19 (2001).

Schuchat, A., Deaver, K.A., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Mscola, L., Pinner, R.W., Reingold, A.L., Broome, C.V., “Role of foods in sporadic Listeriosis”, *The Journal of the American Medical Association*, 267 (15): 2041-2045 (1992).

Seeliger, H.P.R., Bockemühl, J., “Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria monocytogenes*”, *Zbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg. I. Orig.*, 206: 216-217 (1968).

Seeliger, H.P.R., Joner, D., In: P.H.A. Sneath, N.S. Maine, M.E. Sharpe, J.G. Holt (editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, *Williams and Wilkins*, Baltimore, 1235-1245 (1986).

Seeliger, H.P.R., Jones, D., “*Listeria* In: Sneath P. H.A., Mair N., Sharpe M. E., Holt J. G. (eds), Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, *Williams and Wilkins*, London, 1235-1245 (1986).

Seeliger, H.P.R., “Serovar of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species”, In: Woodbine, M. (Ed.), Problems Of Listeriosis, *Leicester University*, Press Surrey, 1975: 27-29 (1988).

Seeliger, H.P.R., “Listeriosis history and actual developments.”, *Journal of Infection*, 2: 80-84 (1988).

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

Serter, D., Ertem, E., Gökengin, D. “Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları”, *Nobel Kitabevi*, İzmir, 213-218 (2000).

Shelef, L.A., Potluri, V., “Behavior of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates”, *Food Microbiology*, 12: 221-227 (1995).

Solano-Lopez, C., Hernandez-Sanchez, H., “Behaviour of *Listeria monocytogenes* During Manufacture and Ripening of Manchego and Chihuahua Mexican Cheese”, *International Journal of Food Microbiology*, 62:149-153 (2000).

Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M., “Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface”, *Letters in Applied Microbiology*, 38: 428-432 (2004).

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., Svabic- Vlahovic, M., “A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation”, *Journal of Microbiological Methods*, 40:175–9 (2000).

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Ventura, G.B., Djukic, S., Irkovic, I.C., Ruzicka, F., “Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*”, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 115: 891–9, (2007).

Stewart, P.S., Costerton, J.W., “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, *The Lancet*, 358: 135-138 (2001).

Schlyter, J.H., Glass, K.A., Loeffelholz, J., Degnan, A.J., Luchansky, J.B., “The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries”, *International Journal of Food Microbiology*, 19: 271-281 (1993).

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.H., “Microbiological safety of drinking water”, *Annual Review of Microbiology*, 54: 81-127 (2000).

Topcu, S., “Ankara’da Satışa Sunulan Döner Kebap Çeşitlerinden *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* İzolasyonu ve Çeşitli Antibiyotiklere Dirençlilikleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 32 (2006).

Tunail, N., “Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları”, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, Ankara, 522 (2000).

Ulusoy, H., “Çiğ süt ve peynir örneklerinde koliform grubu mikroorganizma/*E. coli* ile birlikte *Y. enterocolitica* izolasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 97-98 (2004).

Uysal, H.K., Anđ, Ö., “Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Listeria* türleri”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33: 163-169 (2003).

Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Zehnder, A.J.B., “Physical and chemical description of bacterial adhesion”, *Journal of Biomaterials Applications*, 5: 91–106 (1990).

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

White, D. G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D. ve Mcdermott, P. F., “Antimicrobial resistance of foodborne pathogens”, *Microbes and Infection*, 4: 405-412 (2002).

Williams, P., “Quorum sensing”, *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 57-9 (2006).

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

Yıldız, E., “*Listeria monocytogenes* İnöküle Edilmiş ve Buzdolabı Sıcaklığında Saklanan Etlere Gıda Kalitelendirici Organik Asitlerin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 17-19 (2005).

Zobell, C.E., “The effect of solid surfaces upon bacteria activity”, *Journal of Bacteriology*, 46: 39-56 (1943).

Zottola, E.A., Sasahara, K.C., “Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern?”, *International Journal of Food Microbiology*, 23: 125–148 (1994).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : YILDIRIM, Havva  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 31.01.1987, Ankara  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0 (507) 580 56 48  
e-mail : [h.yildirim12@hotmail.com](mailto:h.yildirim12@hotmail.com)

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Başkent Lisesi	2004

### Yabancı Dil

İngilizce

### Hobiler

Sinema, Müzik dinlemek, Kitap okumak, Yüzmek, Yürüyüş yapmak