



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**



**EZİNE PEYNİRİ ÜRETİM HATTINDA DEZENFEKSİYONUN YENİ  
DEZENFEKTAN FORMÜLLERİ İLE YAPILABİLİRLİĞİ:  
ANTİBİYOFİLM-ANTIQUORUM SENSİNG MADDELER**

**Dilvin İPEK**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**T.C.**  
**ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**EZİNE PEYNİRİ ÜRETİM HATTINDA DEZENFEKSİYONUN YENİ  
DEZENFEKTAN FORMÜLLERİ İLE YAPILABİLİRLİĞİ:  
ANTİBİYOFİLM-ANTİQUORUM SENSİNG MADDELER**

**Dilvin İPEK**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 10/07/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer DEMİREL ZORBA**

**Eş Danışman:**

**Prof. Dr. Ji Hyang KWEON**

**ANAkkALE**

Dilvin İPEK tarafından Yrd. Doç. Dr. Nükhet N. DEMİREL ZORBA yönetiminde ve Prof. Dr. Ji Hyang KWEON ikinci danışmanlığında hazırlanan ve **10/07/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Ezine Peyniri Üretim Hattında Dezenfeksiyonun Yeni Dezenfektan Formülleri ile Yapılabilirliği: Antibiyofilm-Antiquorum Sensing Maddeler**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Yrd. Doç. Dr. Nükhet N. DEMİREL ZORBA .....

**Başkan**

Prof. Dr. Yonca KARAGÜL YÜCEER .....

**Üye**

Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU .....

**Üye**

Doç. Dr. Gülten TİRYAKİ GÜNDÜZ .....

**Üye**

Doç. Dr. İlkin YÜCEL ŞENGÜN .....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FDK-BAP-908

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Dilvin İPEK

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Nükhet N. DEMİREL ZORBA ve eş danıŐmanım Sayın Prof.Dr. Ji Hyang KWEON'a, fikir ve tecrübeleri ile çalışmanın olgunlaŐmasında büyük emeği olan Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof.Dr. Yonca KARAGÜL YÜCEER ve Prof.Dr. Fatma ARIK OLAKOğLU'na, Quorum Sensing konusunda benim ile tecrübelerini paylaŐan Sayın Yrd.Doç.Dr. Harshade LADE'ye, çalışma boyunca hava örnekleme cihazını bize sağlayan evre Mühendisliği öğretim üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Sibel MENTEŐE'ye, paslanmaz elik plakalar ve korozyon konusunda bizimle bilgilerini paylaŐan Malzeme Bilimi ve Mühendisliği öğretim üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Volkan ESKİZEYBEK'e, SEM-EDX analizlerimizde bize çok yardımcı olan Öğr.Gör. Nilay TEZEL'e, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen çalışma arkadaşlarıma, gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı ekibine, FDK-BAP-908 proje numarası ile çalıŐmayı destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koodinasyon Birimine ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme, eŐime, oğlum Ali Uraz İPEK'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Dilvin İPEK

anakkale, Temmuz 2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| %               | Yüzde Oran             |
| dk              | Dakika                 |
| Sn              | Saniye                 |
| v.b.            | Ve Benzeri             |
| pH              | Asitlik                |
| °C              | Santigrat Derece       |
| n               | Örnek Sayısı           |
| Ort.            | Ortalama Değer         |
| SD              | Standart Sapma         |
| rpm             | Dakikada Devir Sayısı  |
| mm              | Milimetre              |
| mg              | Miligram               |
| mL              | Mililitre              |
| L               | Litre                  |
| µg              | Mikrogram              |
| µL              | Mikrolitre             |
| µm              | Mikrometre             |
| nm              | Nanometre              |
| kob             | Koloni Oluşturan Birim |
| cm <sup>2</sup> | Santimetrekare         |
| m <sup>3</sup>  | Metreküp               |
| log             | Logaritma              |
| ppm             | Milyonda Bir Kısım     |
| UV              | Ultra Viyole           |
| Fe              | Demir Elementi         |
| Cr              | Krom Elementi          |
| Ni              | Nikel Elementi         |
| C               | Karbon Elementi        |
| Mn              | Manganez Elementi      |
| P               | Fosfor Elementi        |
| Mo              | Molibden Elementi      |
| N               | Azot Elementi          |

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| Sn   | Kalay Elementi                     |
| Si   | Silisyum Elementi                  |
| Cb   | Niobiyum Elementi                  |
| B    | Bor Elementi                       |
| ATP  | Adenozin Trifosfat                 |
| UHT  | Ultra Yüksek Isı                   |
| SEM  | Taramalı Elektron Mikroskobu       |
| EDX  | Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi   |
| ATP  | Adenozin Trifosfat                 |
| SS   | Paslanmaz Çelik                    |
| OD   | Optik Yoğunluk                     |
| N    | Normalite                          |
| EGCG | Epigallocatecine gallat            |
| MİK  | Minimum İnhibitör Konsantrasyon    |
| MBK  | Minimum Bakterisidal Konsantrasyon |
| QQ   | Quorum Quenching                   |

## ÖZET

# EZİNE PEYNİRİ ÜRETİM HATTINDA DEZENFEKSİYONUN YENİ DEZENFEKTAN FORMÜLLERİ İLE YAPILABİLİRLİĞİ: ANTİBİYOFİLM-ANTİQUORUM SENSİNG MADDELER

Dilvin İPEK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Nükhet N. DEMİREL ZORBA

İkinci Danışman : Prof.Dr. Ji Hyang KWEON

10/07/2017, 166

Çalışmada Ezine peyniri üretim hattında biyofilm oluşumuna neden olabilecek mikroorganizmaların belirlenmesi, bunların gelişimini engelleyebilecek antiquorum sensing etkili doğal maddeler ile hazırlanan doğal dezenfektan geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla üretim hattında belli noktalardan ATP Biyoluminesans ve standart swap yöntemi ile örnek alınmış, ayrıca işletmelerin üretim ve dolun alanlarının hava yükleri ve su örneklerinin mikrobiyal yükü de belirlenmiştir. Yüzeylelerden, hava ve su örneklerinden alınan bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma potansiyelleri kristal viyole mikropalak ve Congo red agar yöntemleri ile araştırılmıştır. Seçilen 18 doğal maddenin %70'lik etil alkol kullanılarak ekstraktları hazırlanmış; antibiyofilm etkileri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir. AHL ve AI-2 sinyallerini kesme etkileri *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136 ve *Vibrio harveyi* BB 170 indikatör mikroorganizmaları ile belirlenmiştir.

Geliştirilen dezenfektan formüllerinin sesil ve biyofilm oluşturan hücreler üzerine etkisi çalışmada izole edilen *Bacillus coagulans* ve *Enterobacter cloacea* bakterileri üzerinde çelik plakalarda UHT süt kullanılarak araştırılmış; ayrıca formülün korozif etkisi SEM-EDX analizleri ile CIP ve perasetik asit uygulamasıyla karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak üretim alanlarında yaygın olarak *Bacillus* spp. kontaminasyonu olduğu (%100) belirlenmiştir. Bunu *Enterobacteriaceae* (%86,67) ve *Pseudomonas* (%75,55) türlerinin izlediği görülmüştür. Kontaminasyonun en fazla su, plastik boru ve duvarlarda olduğu belirlenmiştir. İncelenen doğal maddelerden EGCG'nin en etkili antimikrobiyal ve



QQ madde olduğu belirlenmiştir (MİK:250µg/ml). Diğer bir önemli doğal madde olan boraksın AI-2 sinyalleri üzerine QQ etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bu maddelerin etkinliğini arttırmak için, EDTA ve NaCl ilave edilerek hazırlanan formüllerin 5 dk uygulamasının elik plakalarda biyofilm oluşturan hücre sayısında yaklaşık 6 logkob/cm<sup>2</sup> azalma sağladığı, sesil hücreler üzerine ise 6 logaritmik değerlik bir düşüş sağladığı, etkinliğinin perasetik asitin 15 dk uygulaması ile eşdeğer olduğu belirlenmiştir. Perasetik asitin 316 L paslanmaz elik yüzeylerde korozif etkisine karşın bu formüllerin yüzeylerde korozif olmadığı SEM-EDX analizi ile belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Doğal Maddeler, Biyofilm, Antiquorum Sensing, Dezenfeksiyon.



## ABSTRACT

### APPLICABILITY OF EZINE CHEESE PROCESS LINES DISINFECTION BY NEW DISINFECTANT FORMULAS: ANTIBIOFILM-ANTIQUORUM SENSING AGENTS

Dilvin İPEK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Food Science

Advisor : Assist. Prof. Dr. Nükhet N. DEMİREL ZORBA

Co-Advisor: Prof. Dr. Ji Hyang KWEON

10/07/2017, 166

The aim of this study is determining biofilm formable microorganisms and natural disinfectant that was produced by quorum sensing active natural compounds. For this aim, samples were taken from determined process lines' points by ATP-bioluminance and standard swabbing methods. Also, microbial floras of water, production and filling areas were determined. Biofilm formation capacities of surfaces, water and air isolated bacteria were researched by crystal violet microplate and Congo red agar methods. Chosen 18 natural compound's 70% ethanolic extracts were prepared; antibiofilm effects were determined by disc diffusion and microdilution methods. AHL and AI-2 signals' breaking activity of these compounds were determined by using indicator microorganisms *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136 and *Vibrio harveyi* BB 170. Effects of developed disinfectant formulations were searched on isolated *Enterobacter cloacae* and *Bacillus coagulans* by using SS 316 L coupons and UHT milk. Corrosion effects of these formulas were determined by SEM-EDX analysis and also, compared to CIP and peracetic acid applications.

As a result, prevalent *Bacillus* spp. contamination were determined in process areas (%100). Then *Enterobacteriaceae* (%86,67) and *Pseudomonas* (%75,55) species' contaminations were determined also. Sources of contaminations were examined like water, plastic pipes and walls. EGCG was determined as more effective antimicrobial-antibiofilm and quorum sensing compounds than other analyzed compounds (MIC: 250µg/ml). Other important natural compound borax was determined as quorum sensing active on

AI-2 signals. For increasing the activity, EDTA and NaCl were added to disinfectant formula. 5 min application to these formulas on stainless steel coupons decreased nearly 6 logcfu/cm<sup>2</sup> to biofilm formable cells and sessile cells were decreased nearly 6 logarithmic value. This activity value was equal to 15 min peracetic acid application. Peracetic acid was determined as corrosive on stainless steel 316 L, when formulas were not corrosive by SEM-EDX analyses.

**Keywords:** Natural Compounds, Biofilm, Antiquorum Sensing, Disinfection.



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|  |      |
|--|------|
| TEZ SINAV SONUÇ FORMU .....  | ii   |
| İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....  | iii  |
| TEŞEKKÜR.....  | iv   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....  | v    |
| ÖZET .....   | vii  |
| ABSTRACT.....  | ix   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....  | xvii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....  | xix  |
| BÖLÜM 1  |      |
| GİRİŞ .....  | 1    |
| BÖLÜM 2  |      |
| ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....  | 3    |
| 2.1. Ezine Peyniri Üretimi, Üretim Hattı Temizlik ve Dezenfeksiyonu .....                                      | 3    |
| 2.1.1. Ezine Peyniri ve Özelliği.....  | 3    |
| 2.1.2. Ezine Peyniri ve Beyaz Peynir Üretimi Metodu .....  | 4    |
| 2.1.3. Ezine Peyniri ve Beyaz Peynir Üretiminde Üretim Hattı Temizliği, Hijyen ve Sanitasyonu .....            | 5    |
| 2.1.3.1. CIP-Yerinde Temizlik Sistemi .....  | 6    |
| 2.1.3.2. COP-Dışarıda Temizlik Sistemi.....  | 6    |
| 2.1.3.3. Dezenfeksiyon Yöntemleri.....   | 7    |
| 2.2. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Biyofilm Oluşumu ve Quorum Sensing.....                             | 8    |
| 2.2.1. Biyofilm Tanımı, Mekanizması ve Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar ....                              | 8    |
| 2.2.1.1. Biyofilm Tanımı .....   | 8    |
| 2.2.1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları .....   | 8    |
| 2.2.1.3. Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar.....  | 10   |
| 2.2.2. Quorum Sensing ve Biyofilm Oluşumuna Katkısı, Antiquorum Sensing.....                                   | 10   |
| 2.2.2.1. Quorum Sensing .....  | 10   |
| 2.2.2.2. Quorum Sensing Sinyal Molekülleri .....   | 11   |
| 2.2.2.3. Quorum Sensing'in Biyofilm Oluşumuna Katkısı .....  | 13   |
| 2.2.2.4. Antiquorum sensing (Quorum Quenching) .....   | 13   |
| 2.2.2.4.1. Doğal Ekstraktların Antiquorum sensing Etkisi.....  | 14   |
| 2.2.3. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Kullanılan Yüzeyler, Korozyon ve Biyofilm Oluşumu ile İlgisi..... | 17   |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.3.1. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Kullanılan Yüzeyler .....  | 17        |
| 2.2.3.2. Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Korozyon.....   | 19        |
| 2.2.3.3. Paslanmaz Çelik Yüzey Korozyonunun Biyofilm Oluşumuna Etkisi.....  | 20        |
| <b>BÖLÜM 3</b>  |           |
| <b>MATERYAL VE METOT .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1. Araştırma Planı.....   | 22        |
| 3.2. Çalışma 1. Peynir Üretim Hatlarının Mikrobiyolojik Yükünün Belirlenmesi,<br>İzolatların Alınması, Tanımlanması, Biyofilm Kapasitesinin ve Quorum Sensing Sinyal<br>Varlığının Belirlenmesi ..... | 23        |
| 3.2.1. Yüzey Örnekleme .....  | 23        |
| 3.2.2. Kültürler .....  | 23        |
| 3.2.3. Yöntem .....   | 23        |
| 3.2.3.1. Yüzey, Su ve Hava Örneklerinin Alınması .....  | 23        |
| 3.2.3.2. Test Örneği Hazırlama Metodu .....   | 24        |
| 3.2.3.3. Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı (AMB) .....   | 24        |
| 3.2.3.4. <i>Bacillus</i> spp. Sayımı .....  | 24        |
| 3.2.3.5. <i>Enterobacteriaceae</i> Sayımı .....   | 25        |
| 3.2.3.6. <i>Pseudomonas</i> spp. Sayımı .....   | 25        |
| 3.2.3.7. <i>Listeria</i> spp. Sayımı.....   | 25        |
| 3.2.3.8. Bakterilerin Saf Kültür Haline Getirilmesi .....   | 25        |
| 3.2.3.9. API Kitleri ile Fenotipik Olarak Tanımlama.....  | 26        |
| 3.2.3.9.1. Okidaz Testi .....   | 26        |
| 3.2.3.9.2. Katalaz Testi.....   | 26        |
| 3.2.3.9.3. Glikozun Oksijenli ve Oksijensiz Kullanımı.....  | 27        |
| 3.2.3.9.4. MacConkey Agar'da Üreme .....  | 27        |
| 3.2.3.9.5. Voges-Proskauer Testi .....  | 27        |
| 3.2.3.9.6. Metil Red Testi .....  | 27        |
| 3.2.3.9.7. Karbonhidrat Fermantasyonu Testi .....   | 27        |
| 3.2.3.9.8. Hareketlilik Testi .....   | 28        |
| 3.2.3.9.9. Hemoliz Testi .....  | 28        |
| 3.2.3.10. <i>Streptococcus</i> spp.'nin Fenotipik Tanımlanması .....  | 28        |
| 3.2.3.11. İzolatların Biyofilm Kapasitesinin Belirlenmesi .....   | 28        |
| 3.2.3.11.1. Congo Red Agar Yöntemi ile Belirlenmesi .....   | 28        |
| 3.2.3.11.2. Kristal Viyole Mikroplaka Yöntemi ile Belirlenmesi .....  | 29        |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3.12. Quorum Sensing Sinyal Varlığının Ortaya Konulması (AHL-AI-2) .....  | 30 |
| 3.2.3.12.1. AHL Sinyal Varlığının Ortaya Konulması.....   | 30 |
| 3.2.3.12.2. AI-2 Sinyal Varlığının Ortaya Konulması .....   | 31 |
| 3.2.3.13. İstatistiksel Analizler .....   | 31 |
| 3.3. Çalışma 2. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturan İzolatlar<br>Üzerine Etkili Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddelerin Belirlenmesi<br>.....          | 32 |
| 3.3.1. Kullanılan Kültürler .....   | 32 |
| 3.3.2. Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddeler .....  | 32 |
| 3.3.3. Yöntem .....   | 33 |
| 3.3.3.1. Doğal Maddelerden Ekstrakt Eldesi.....   | 33 |
| 3.3.3.2. Antimikrobiyal Etki Analizi (Antibiyofilm) .....   | 34 |
| 3.3.3.3. Antiquorum Sensing Etki Analizi (AHL, AI-2).....   | 34 |
| 3.3.3.3.1. AHL Sinyallerinin İnhibisyonu .....  | 34 |
| 3.3.3.3.2. AI-2 Sinyallerinin İnhibisyonu.....  | 35 |
| 3.3.3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK), Minimum Bakterisidal<br>Konsantrasyon (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%inhibisyon) Değerlerinin<br>Belirlenmesi.....                           | 35 |
| 3.4. Çalışma 3. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturabilen<br>İzolatların Üzerine Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Geliştirilmesi.....                             | 37 |
| 3.4.1. Materyal.....  | 37 |
| 3.4.1.1. Kullanılan Kültürler .....   | 37 |
| 3.4.1.2. Kombinasyon Denemesi için Kullanılan Doğal Maddeler.....   | 37 |
| 3.4.1.3. Yeni Dezenfektan Formülleri Geliştirilmesi .....   | 37 |
| 3.4.2. Yöntem .....   | 38 |
| 3.4.2.1. Antimikrobiyal Etki Analizi .....  | 38 |
| 3.4.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK), Minimum Bakterisidal<br>Konsantrasyon (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%inhibisyon) Değerlerinin<br>Belirlenmesi.....                           | 38 |
| 3.5. Çalışma 4. Antibiyofilm-Antiquorum Sensing Etkili Yeni Dezenfektan<br>Formüllerinin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Dezenfektan Etkinliği ve Korozyon<br>Oluşturma Durum Tespiti ..... | 40 |
| 3.5.1. Materyal.....  | 40 |
| 3.5.1.1. Kullanılan Kültürler .....   | 40 |
| 3.5.1.2. Kullanılan Çelik Plaka Kuponlar .....  | 40 |
| 3.5.2. Yöntem .....   | 40 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.2.1. Çelik Plaka Yüzeyler Üzerine Kullanılacak Temizlik ve Dezenfeksiyon Yönteminin Belirlenmesi .....  | 40        |
| 3.5.2.2. Çelik Plaka Yüzeylerinin Pasifizasyonu .....   | 40        |
| 3.5.2.3. Çelik Plaka Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturulması.....   | 41        |
| 3.5.2.4. Çelik Plaka Dezenfektan Etkinliği Analizi .....  | 41        |
| 3.5.2.4.1.Çelik Plaka Yüzeylerinde Sesil ve Biyofilm Oluşturabilen Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi.....   | 42        |
| 3.5.2.5. Temizlik ve Dezenfeksiyon Sürecinde Kullanılan Maddelerin Çelik Plaka Yüzeylerinde Korozyon Etkisinin Belirlenmesi.....  | 42        |
| 3.5.2.5.1. SEM-EDX Analizi ile Korozyon Tespiti için Örneklerinin Hazırlanması.....   | 42        |
| 3.5.2.5.2. SEM-EDX Analizi ile Korozyon Tespiti .....   | 43        |
| <b>BÖLÜM 4</b>  |           |
| <b>ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>  | <b>44</b> |
| 4.1. Peynir Üretim Hatlarının Mikrobiyolojik Yükünün Belirlenmesi, İzolatların Alınması, Tanımlanması, Biyofilm Kapasitesinin ve Quorum Sensing Sinyal Varlığının Belirlenmesi .....                | 44        |
| 4.1.1. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatları/Alanlarının ve Temizlik Dezenfeksiyon Programlarının Değerlendirilmesi .....  | 44        |
| 4.1.2. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatlarındaki Yüzeylerden Alınan Örneklerin Mikrobiyal Yükleri .....   | 47        |
| 4.1.2.1. Yüzeylerden Alınan Örneklerin Aerobik Mezofilik Bakteri Yükleri .....  | 50        |
| 4.1.2.2. Yüzeylerden Alınan Örneklerin <i>Enterobacteriaceae</i> Yükleri .....  | 52        |
| 4.1.2.3. Yüzeylerden Alınan Örneklerin <i>Pseudomonas</i> spp. Yükleri .....  | 53        |
| 4.1.2.4. Yüzeylerden Alınan Örneklerin <i>Bacillus</i> spp. Yükleri .....   | 54        |
| 4.1.2.5. Yüzeylerden Alınan Örneklerin <i>Listeria</i> spp. Yükleri .....   | 55        |
| 4.1.2.6. Alınan Yüzey Örnekleri Yüklerinin Standart Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı ve Hızlı ATP-Biolüminans Metodu ile Karşılaştırılması .....  | 56        |
| 4.1.2.7. Alınan İşletme Suyu Örneklerinin Yükleri .....   | 58        |
| 4.1.2.8. İşletme Üretim ve Dolum Alanları Hava Örneklerinin Mikrobiyal Yüklerinin Belirlenmesi .....  | 59        |
| 4.1.3. Temizlik Prosedürü Uygulamasının Üretim Yüzeyleri Mikrobiyal Yüküne Etkisinin Belirlenmesi .....   | 61        |
| 4.1.4. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatlarındaki Yüzeylerden Elde Edilen İzolatların Tanımlanması, Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin ve Quorum Sensing Sinyal Varlıklarının İncelenmesi..... | 63        |
| 4.1.4.1. Elde Edilen İzolatların Tanımlanması.....  | 63        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.1.4.2. Elde Edilen İzolatların API Kitleri ile Tanımlanması .....  | 65         |
| 4.1.4.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyelleri .....   | 75         |
| 4.1.4.3.1. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Congo Red Agar Yöntemi İle Tespiti.....  | 75         |
| 4.1.4.3.2. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Kristal Viyole Mikroplaka Yöntemi İle Tespiti .....  | 77         |
| 4.1.3.3. İzolatların Quorum Sensing Sinyallerinin Varlığının Araştırılması (AHL, AI-2) .....   | 84         |
| 4.1.3.3.1. Gram Negatif İzolatların AHL Sinyallerinin Varlığının Araştırılması ..  | 84         |
| 4.1.3.3.2. Gram Pozitif İzolatların AI-2 sinyallerinin Varlığının Araştırılması ..   | 85         |
| 4.2. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Pozitif İzolatları Üzerine Etkili Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddelerin Belirlenmesi .....           | 89         |
| 4.2.1. Doğal Ekstraktların Antimikrobiyal-Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi ..  | 89         |
| 4.2.2. Doğal Ekstraktlarının Antiquorum sensing Özelliklerinin Belirlenmesi .....  | 93         |
| 4.2.2.1. Doğal Ekstraktların AHL Sinyalleri Üzerine Antiquorum sensing Etkisi  | 93         |
| 4.2.2.2. Doğal Ekstraktlarının AI-2 Sinyalleri Üzerine Quorum Quenching Etkisi ..  | 97         |
| 4.2.3. Doğal Ekstraktlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK), Minimum Bakterisidal Etki Konsantrasyonunun (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%İhb.) Belirlenmesi.....     | 100        |
| 4.3. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturan İzolatlar Üzerine Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Geliştirilmesi.....                                | 107        |
| 4.3.1. Doğal Madde Kombinasyonlarının Antimikrobiyal Etki Analizleri.....  | 107        |
| 4.3.2. Yeni Dezenfektan Madde Geliştirme Çalışmaları.....  | 113        |
| 4.4. Antibiyofilm-Antiquorum Sensing Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Dezenfektan Etkinliği ve Korozyon Oluşturma Durum Tespiti ..... | 118        |
| 4.4.1. Antibiyofilm- Antiquorum Sensing Etkili Yeni Kombinasyonların Çelik Plaka Yüzeylerinde Dezenfektan Etkinliği Analizi .....  | 119        |
| 4.4.2. CIP, Ticari ve Doğal Dezenfektan Maddelerin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Korozyon Tespiti Analizi .....  | 126        |
| <b>BÖLÜM 5</b>   |            |
| <b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>  | <b>134</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>   | <b>138</b> |
| <b>EKLERİ .....</b>  | <b>I</b>   |



|  |     |
|--|-----|
| EK 1. Şekil 1. Çalışmanın İş Akış Planı .....  | II  |
| EK 2. Şekil 2. <i>Streptococcus</i> spp. Tanımlama Anahtarı (Cullimore, 2000) .....  | III |
| EK 3. Çizelge 1. İçerikten Hazırlanan Besiyerler .....   | IV  |
| EK 4. Şekil 3. Kromojenik Hicrome <i>Bacillus</i> Agar'da (92325, Sigma-Aldrich, İsviçre)<br>Koloni Renlerine Göre <i>Bacillus</i> spp. .... | V   |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | VI  |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|  |     |
|--|-----|
| Şekil 2.1. Firma B Ezine peyniri üretim hattı .....  | 5   |
| Şekil 2.2. Örnek bir CIP sistemi çizimi .....  | 6   |
| Şekil 2.3. Bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturma aşamaları .....   | 10  |
| Şekil 2.4. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin QS sistemi .....  | 12  |
| Şekil 3.1. Congo Red Agar’da pozitif (A) ve negatif (B) reaksiyon veren mikroorganizmalar .....  | 29  |
| Şekil 3.2. Kristal viyole mikropilaka yöntemi uygulanışı .....   | 30  |
| Şekil 3.3. <i>Cichorium intybus</i> , <i>Calendula officinalis</i> , propolis, resveratrol, <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , boraks, nisin fotoğrafları .....                              | 33  |
| Şekil 3.4. Disk difüzyon (Kirby-Bauer) metodu ile antimikrobiyal-antibiyofilm analizi ...  | 34  |
| Şekil 3.5. MİK analiz (A), % İnhibisyon analizi (B), MBK analizi (C).....  | 36  |
| Şekil 4.1. Firmaların yerleşimi ve üretim hattı akış yönü.....   | 45  |
| Şekil 4.2. Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturduğu belirlenen Gram pozitif izolatların kristal viyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi..  | 78  |
| Şekil 4.3. Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturduğu belirlenen Gram negatif izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi...  | 78  |
| Şekil 4.4. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen <i>Listeria spp.</i> ’lerin kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi .....  | 79  |
| Şekil 4.5. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen CFC Agar kullanılarak izole edilmiş izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi .....                    | 81  |
| Şekil 4.6. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen VRBGA Agar kullanılarak izole edilen izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi .....                   | 81  |
| Şekil 4.7. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen Hicrome <i>Bacillus</i> Agar kullanılarak izole edilen izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi ..... | 82  |
| Şekil 4.8. Gram negatif bakterilerde AHL sinyal varlığının tespiti.....  | 84  |
| Şekil 4.9. <i>Listeria spp.</i> AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol).....   | 86  |
| Şekil 4.10. <i>Streptococcus spp.</i> AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol)....  | 86  |
| Şekil 4.11. Hicrome <i>Bacillus</i> Agar kullanılarak izole edilmiş izolatların AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol) .....  | 87  |
| Şekil 4.12. Disk difüzyon metodu ile antiqourum sensing analizi .....  | 94  |
| Şekil 4.13. 25 nolu <i>S. bovis</i> ’in AI-2 sinyallerinin yüzde inhibisyonunun belirlenmesi metodu ile Antiquorum sensing analizi .....   | 98  |
| Şekil 4.14. En yüksek AI-2 sinyalleri veren izolatların en yüksek %inhibisyon değeri olan EGCG ve %70’lik etil alkol ile gelişim durumu.....   | 99  |
| Şekil 4.15. E(EGCG) ile T(Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri .....   | 114 |
| Şekil 4.16. B (Boraks) ile T (Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri .....   | 115 |
| Şekil 4.17. E (EGCG), B (Boraks) ile T (Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri .....   | 115 |
| Şekil 4.18. Çelik plakalar üzerinde 24 saatlik biyofilm oluşumu, CIP ve dezenfektanların uygulaması .....  | 119 |
| Şekil 4.19. Paslanmaz çelik 316 L plakaların SEM görüntüleri.....  | 127 |
| Şekil 4.20. Paslanmaz çelik 316 L plakaların EDX analizi 1 .....   | 129 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

|  |     |
|--|-----|
| Çizelge 2.1. Paslanmaz çelik (SS) 304, 304 L ve 316, 316 L içerikleri (% ağırlık).....   | 19  |
| Çizelge 4.1. İşletmelerde kullanılan temizlik prosedürleri .....   | 46  |
| Çizelge 4.2. A Firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm <sup>2</sup> ) .....   | 48  |
| Çizelge 4.3. B firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm <sup>2</sup> ).....  | 49  |
| Çizelge 4.4. C firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm <sup>2</sup> ).....  | 50  |
| Çizelge 4.5. ATP- Biyoluminesans ve standart metotlarının kullanımıyla yüzey yükleri ..  | 57  |
| Çizelge 4.6. Firma A, B ve C üretim ve dolun havası aerobik mezofilik bakteri sayısı ...   | 60  |
| Çizelge 4.7. Firma B yüzeylerinin temizlik uygulaması öncesi ve sonrası mikrobiyal yükü .....  | 62  |
| Çizelge 4.8. İzole edilen bakterilerin örnek noktaları, cinsleri ve sayıları .....   | 64  |
| Çizelge 4.9. Şüpheli <i>Listeria</i> spp. izolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları.....                               | 65  |
| Çizelge 4.10. Şüpheli <i>Pseudomonas</i> spp. izolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları.....                           | 67  |
| Çizelge 4.11. Şüpheli <i>Enterobacteriaceae</i> İzolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları.....                         | 69  |
| Çizelge 4.12. Şüpheli <i>Bacillus</i> spp. kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları.....                                     | 70  |
| Çizelge 4.13. Firma yüzeylerinde izole edilen <i>Streptococcus</i> spp.'lerin tanımlanması .....   | 72  |
| Çizelge 4.14. Doğal maddelerin antimikrobiyal madde analizlerinde zon çapları sonuçları .....  | 90  |
| Çizelge 4.15. Doğal maddelerin AHL sinyalleri için QQ analizlerinde zon çapları sonuçları .....  | 95  |
| Çizelge 4.16. Doğal antimikrobiyal maddelerin MIK, MBK ve %İnhibisyon değerleri... 101   | 101 |
| Çizelge 4.16.'in devamı .....  | 102 |
| Çizelge 4.16.'in devamı .....  | 103 |
| Çizelge 4.16.'in devamı .....  | 104 |
| Çizelge 4.17. Doğal madde kombinasyonlarının antimikrobiyal etki zon çapları (mm)*. 108  | 108 |
| Çizelge 4.17'nin Devamı* .....   | 109 |
| Çizelge 4.17'nin Devamı* .....   | 110 |
| Çizelge 4.18. EGCG ve Boraks 1 kombinasyonun antimikrobiyal etki zon çapları, MIK, MBK ve %İnhibisyon değeri .....   | 111 |
| Çizelge 4.19. EGCG ve Boraks 1 kombinasyonun% 1 NaCl, %0,16 EDTA ve %0,32 EDTA solüsyonları ile farklı oranlarda karışımlarının % İnhibisyon değerleri .....                     | 116 |
| Çizelge 4.19.'un Devamı .....  | 117 |
| Çizelge 4.20. CIP ve dezenfektan uygulaması öncesi/sonrası çelik plakalar yüzeylerinden elde edilen sesil/biyofilm oluşturabilir hücre sayıları, n=6 (kob/cm <sup>2</sup> )..... | 120 |
| Çizelge 4.21. Paslanmaz çelik 316 L plakalarındaki kırık genişlikleri (µm) .....   | 128 |
| Çizelge 4.22. Paslanmaz çelik 316 L plakalarında EDX analizi element miktarları (%)..  | 130 |

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Ezine peyniri, Çanakkale'nin Ezine, Ayvacık ve Bayramiç yöresinde üretilen, son derece aromatik, lezzetli bir peynir türüdür (Aday ve Karagul-Yuceer, 2008; Yuceer ve ark., 2009; Aday ve ark., 2010). Coğrafi işarete sahip olan ürün; yöre ekonomisi için büyük öneme sahiptir. Ezine peyniri, üretim hatlarında biyofilm oluşumu nedeniyle gerçekleşen çapraz bulaşma sonucunda oluşan kötü koku problemi ile karşı karşıyadır. En az 6 ay soğuk hava depolarında olgunlaştırılan ve paketlenen üründe, bu süreç geri dönülemez bir problem oluşturmakta ve bu durum firmaları olumsuz etkilemektedir.

Biyofilm; üç boyutlu, ekzopolisakkarit (EPS) ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapıdır. Mikroorganizmaların kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak da tanımlanmaktadır (Kumar ve Anand, 1998; Salo ve ark., 2005; Öner ve Ölmez, 2006; Gün ve Ekinci, 2007; Mariana ve ark., 2009; O'Toole, 2011; Magesh ve ark., 2013). Süt ve süt ürünleri sanayinde hammadde olan sütün yağlı oluşu, besinsel değerinin yüksekliği, mikrobiyal yükünün fazlalığı ve üretim ortamının uygun temizlenmemesi nedeniyle üretim hatlarında mikroorganizmaların yüzeylere tutunması ve sonrasında biyofilm oluşturarak sürekli bir mikrobiyal kontaminasyon kaynağına dönüşmesi söz konusu olmaktadır.

Quorum sensing mikroorganizmalar arası iletişim sistemidir. Quorum sensing kullanan mikroorganizmalar kendi çevresini izlemekte, populasyon yoğunluğu hakkında bilgi almakta ve bu bilgileri yeri gelince gen ekspresyonunu ile regüle etmede kullanmaktadır. Bununla birlikte quorum sensing biyofilm oluşumu için önemli bir faktördür. Antiquorum sensing (Quorum Quenching-QQ) ise hücreler arası iletişimin inhibisyonudur. Quorum quenching için kimyasal maddeler, doğal madde ekstraktları, enzimler, antagonistik mikroorganizmalar ve bakteriofajlar kullanılmaktadır (Karaboz ve Sukatar, 2004; Dang ve ark., 2007; Kuyun ve ark., 2009; Eriş, 2011; Skandamis ve Yaşa, 2012; Tan ve ark., 2013; Bai A ve Vittal, 2014; Lade ve ark., 2014; Fetzner, 2015; Federle ve Bassler, 2017).

Süt ve süt ürünleri sanayinde temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri ticari kimyasallar kullanılarak yapılmakta, bu kimyasalların doğru kullanılmaması sonucunda yüzeylerde korozyon ve biyofilm oluşumu görülmektedir. Biyofilm yapısı içerisinde bu kimyasalların etkisinden korunan mikroorganizmalar, ilgili kimyasal maddelere karşı direnç

kazanabilmektedir. Diğer taraftan temizlik ve dezenfeksiyonda kullanılan kimyasallar atık sulara karışmakta ve önemli arıtma maliyetlerine sebep olabilmektedir (Tetrapak, 1995; Metin ve Öztürk, 2003; Kayaardı, 2014).

Bu nedenlerle çalışmada; Ezine peyniri üretim hatlarında kötü koku problemine ve büyük ekonomik kayıplara neden olabilecek biyofilm oluşturan mikroorganizmaların belirlenmesi, ilgili mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal-antibiyofilm ve antiqorum sensing doğal maddelerin tespiti ve etkili doğal maddeler ile korozyona sebep olmayacak doğal dezenfektan formülünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.



## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Ezine Peyniri Üretimi, Üretim Hattı Temizlik ve Dezenfeksiyonu

##### 2.1.1. Ezine Peyniri ve Özelliği

Ezine peyniri, sadece rennet enzimi kullanılarak üretilen ve en az 8 aylık depolama sonucu tüketime sunulabilen salamuralı bir beyaz peynir türüdür. Peynirin kendine has aroma ve lezzeti nedeni ile Türkiye piyasasında yoğun talep görmektedir. Ürün coğrafi işarete sahip olup; Çanakkale'nin Kaz dağlarının eteklerinde bulunan Ezine, Ayvacık ve Bayramiç yöresinde yaklaşık 30 civarında irili ufaklı mandıra genellikle geleneksel yöntemlerle üretim yapmaktadır. Genel olarak, süt ve süt ürünleri üretimi Türk ekonomisinde önemli bir yer tutmaktadır. Bunun yanı sıra beyaz peynir üretimi ise süt ürünleri üretiminin yaklaşık %70'ine sahiptir (Temelli ve ark., 2006). Bu durum Ezine peynirinin başta yöre ve ülkemiz ekonomisi için önemli bir unsur haline gelmesini sağlamaktadır (Karagul-Yuceer ve ark., 2007).

Kaz Dağlarının eteklerindeki otlarla beslenen keçi, koyun ve ineklerden elde edilen sütlerin belirli oranda karıştırılmasıyla üretilen peynir son derece aromatik bir üründür (Manap ve Gül, 2008). Ürün için 2006 yılında alınan coğrafi tescil belgesine göre, ürün mevsimine göre en az %40 keçi sütü, %45-55 koyun sütü ve en fazla %15 inek sütünün karıştırılması ile elde edilmektedir. Dünyada Feta (Yunanistan), Bjalo salamureno sirene (Bulgaristan), Telemea (Yunanistan ve Romanya) ve Domiati (Mısır) gibi benzerleri bulunan Ezine peyniri, çok dikkat çekici duyuşsal karakteristiğe sahiptir. Bu farklı duyuşsal özellik; sütü veren hayvanların yediği otlardan, farklı süt cinslerinin karıştırılma oranlarından, olgunlaşma sırasında meydana gelen kimyasal ve mikrobiyolojik aktivitelerden dolayı ortaya çıkmaktadır (Aday ve Karagul-Yuceer, 2008; Yuceer ve ark., 2009; Aday ve ark., 2010). En az 8 aylık depolama sonucu tüketilebilen ürünün olgunlaşma müdahale edilememektedir.

Yuceer ve ark. (2009), Ezine peynirinin 1 yıllık depolanması sırasında ürünün aromatik bileşenlerinde ve duyuşsal özelliklerinde meydana gelen değişimleri enstrümantal ve duyuşsal analizler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizlerde aroma maddelerindeki artışın 6. aydan sonra (9. ve 12. aylarda) başladığı belirlenmiş; ürün satışlarının en az 6-8 aylık olgunlaşma sonrası yapılması gerekliliği savunulmuştur.

Tuncel ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise Ezine peynirinin 1 yıllık depolanması sırasında proteoliz seviyesinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu

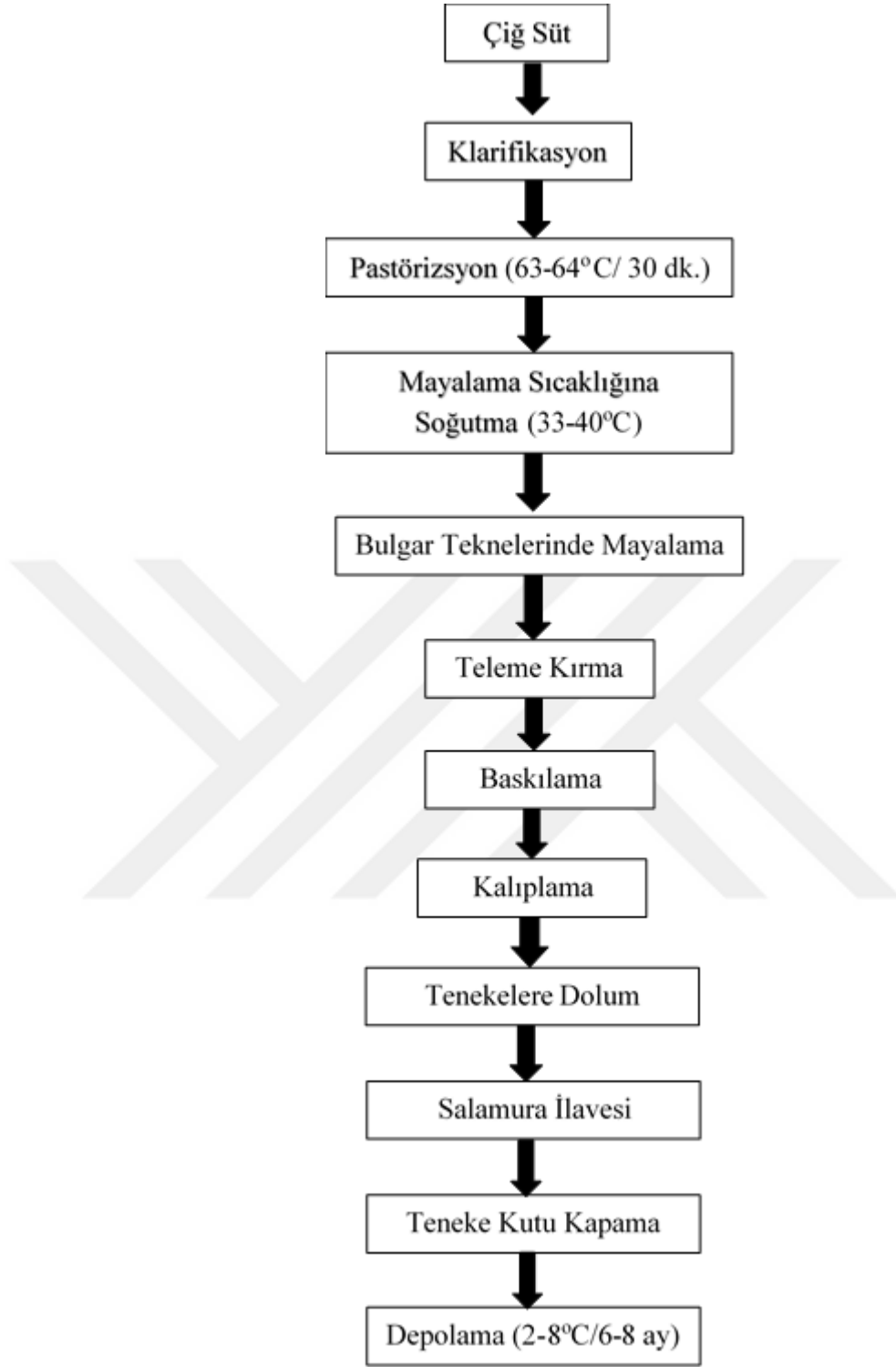
depolama sırasında ürünün kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri de takip edilmiştir. 1 yıllık depolama boyunca ürünün laktik asit seviyesinde artış görülürken; pH, yağ, kurumadde, tuz ve kül miktarlarında önemli bir değişim görülmemiştir. Starter kültür kullanılmadan üretilen üründe laktik asit bakterilerinin varlığı belirlenmiş; bu mikroorganizmaların sayısında ilk üç ayda artış görülürken daha sonraki aylarda önemli bir değişim görülmemiştir. Yine çalışmada proteoliz seviyesinin tespiti için kazein fraksiyonları incelenmiştir. Depolama boyunca  $\beta$ -kazeinin  $\alpha$ -kazeine oranla daha yavaş parçalandığı belirlenmiştir.

### **2.1.2. Ezine Peyniri ve Beyaz Peynir Üretimi Metodu**

Ülkemizde başta Ezine peyniri olmak üzere beyaz peynirler çalışanın ön planda olduğu kesikli sistem ile üretilmektedir. Ülkemizde olgunlaşması gerekmeyen ve peynir mayası yanısıra starter kültür kullanılarak üretilen peynirler olduğu gibi; buzağuların şirdeninden elde edilen rennet enzimi (peynir mayası) ile üretilen ve olgunlaşması gereken peynirler de üretilmektedir. Ezine peyniri, sadece rennet enzimi kullanılarak üretilen ve olgunlaşması gereken peynirler sınıfındadır. Ezine peyniri üretiminde temizlenen, pastörize edilen ve mayalama sıcaklığına düşürülen süt Bulgar teknelerine konulmakta ve burada mayalanmaktadır. Pıhtı oluşumu gerçekleştikten sonra teleme kırma, baskılama, kalıplama, tenekelere dolum, salamura ilavesi, teneke kapama ve depolama işlemleri yapılmaktadır (Şekil 2.1).

Depolama 2-8 °C'de 6 ay ile 8 ay arasında gerçekleşir. Olgunlaşan peynirler teneke kutulardan yine işçilerce çıkarılmakta, porsiyonlanmakta ve ambalajlanmaktadır. Ezine peyniri gibi sert, yarı sert peynirler, içinde alüminyum folyo kullanılmış PVDC (Polivinilidenklorür) ambalaj materyali ile ambaljanarak satışa sunulmaktadır. Bu ambalajın ürün üzerine sıcak vakum ile sarılması ile peynir altı suyunu kaybetmesi önlenir. Ayrıca bazı firmalar PVDC ile kaplanmış ürünü PVC sert tabak ve kapak içine koyarak görsellik sağlamaktadır (Üçüncü, 2005).





Şekil 2.1. Firma B Ezine peyniri üretim hattı (Anonim, 2016)

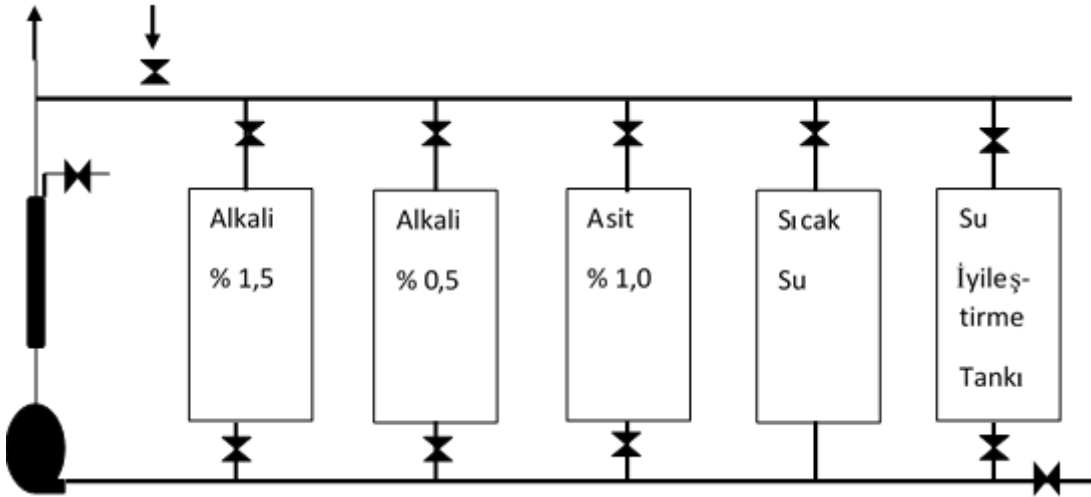
### 2.1.3. Ezine Peyniri ve Beyaz Peynir Üretiminde Üretim Hattı Temizliği, Hijyen ve Sanitasyonu

Ezine peyniri ve diğer beyaz peynir üretim hattı CIP (Clean in Place) yani yerinde temizlik ve COP (Clean out Place), dışarıda temizlik sistemi ile temizlenmektedir.

### 2.1.3.1. CIP-Yerinde Temizlik Sistemi

Bu sistem peynir üretim hatlarında daha çok çiğ süt tankı, pastörizasyon ünitesi, sütün mayalama sıcaklığına düştüğü dinlendirme tankları veya balans tankı, pastörize süt taşıyıcı borular ve bazen çiğ süt taşıyan arabalardaki tanklara uygulanır. Peynir üretim hatlarında CIP ile yerinden sökülmesi zor olan ve daha çok direkt akışkan süt ile temas eden yüzeylerin temizliği hedeflenir (Tetrapak, 1995; Üçüncü, 2005; Lowry, 2010).

CIP sisteminde temizleyici olarak genellikle kimyasal maddeler kullanılır. Süt işletmelerinde CIP sisteminde genellikle kostik (NaOH), asit (nitrik asit veya sülfürik asit), su ve bazen dezenfektan kullanılır (perasetik asit, klor v.b.). Bu sistemde depo tanklarında bekletilen sıvı kimyasallar ekipmanlara pompalanır. Bu aşamada kimyasalların yüzeylere temas süresi, sıcaklığı, konsantrasyonu ve güç/hızı sistem etkinliği için büyük önem taşımaktadır. Temas süresi en az 5 dakika en fazla bir saat arası olmalıdır. Sıcaklık ise genellikle 85-90°C'de uygulanır. Asit uygulamaları 60-70°C'de yapılırken; enzim hazırlanan ünitelerin temizliğinde 55 °C geçilmemelidir. Kostik konsantrasyonu en fazla %1 civarında kullanılırken; asit konsantrasyonu da bu değer civarında olmalıdır (Göktan ve Tunçel, 2014). Başka bir kaynakta ise konsantrasyonlar kostik için %0,2-0,5; asit için %0,08-0,1 arası verilirken, dezenfektanın ise 50-100 ppm civarında bir konsantrasyona sahip olması gerekliliği vurgulanmıştır (Kayaardı, 2014).



Şekil 2.2. Örnek bir CIP sistemi çizimi (Metin ve Öztürk, 2003)

### 2.1.3.2. COP-Dışarıda Temizlik Sistemi

Bu sistem peynir üretim hatlarında daha çok Bulgar tekneleri, bıçaklar, teleme kırma bıçakları, maya maşrapaları (maya kadehi), cendere (jüt) bezleri, yerler, drenaj, duvar,

tavanlar, personel eli gibi üretim hattı yüzeylerinin temizliği için kullanılır. Bu yüzeyler dışında üretim hattına bağlı fakat sökülebilen yüzeylerde COP ile temizlenebilir. Birçok süt işletmesinde süt güğümleri, sütün taşındığı tanklar ve bazen salamura tankları COP ile temizlenmektedir.

Bu temizlik türünde fırça gibi mekanik temizleyiciler; %70'lik etik alkol, klor, ozon ve perasetik asit gibi kimyasallar; basınçlı hava, sıcak su buharı, UV gibi yöntemler kullanılmaktadır (Gibson ve ark., 1999; Demirci ve Gündüz, 2000; Göktan ve Tunçel, 2014). İşletme duvarları, tavanları, tabanları ve drenajlar genellikle soğuk su uygulaması, köpüklü klor veya perasetik asit bazlı dezenfektan uygulaması sonrası buhar tabancası ile temizlenmektedir. Kullanılan bıçaklar, teleme kırma bıçakları ve maşrapalar genellikle su ile yıkandıktan sonra dezenfektanlı suda bekletilirken; Bulgar tekneleri su ile yıkanıp asit veya alkali bazlı deterjanlarla temizlendikten sonra tekrar su ile yıkanmaktadır. Cendere bezleri genellikle asit ya da alkali bazlı deterjanlar ile temizlenip tekrar tekrar kullanılmaktadır (Tetrapak, 1995; Gibson ve ark., 1999; Metin ve Öztürk,2003; Lowry, 2010).

### **2.1.3.3. Dezenfeksiyon Yöntemleri**

Dezenfeksiyon yöntemleri termal ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadır. Termal uygulamalara örnek olarak kaynamış su, sıcak su ve sıcak buhar verilirken; kimyasal uygulamalara örnek olarak klor, asit, iyodoforlar ve hidrojen peroksit verilmiştir (Tetrapak, 1995). Metin ve Öztürk (2003) termal ve kimyasal uygulamalar yanı sıra radyasyon (UV) uygulamasının da kullanıldığını bildirmiştir. UV, işletmelerde genellikle hava temizliği ve bıçakların temizliğinde kullanılmaktadır.

Günümüzde en çok kullanılan yöntemlerden birisi kimyasal dezenfektan uygulamasıdır. Kullanılacak dezenfektanın geniş spektrumlu olması, uygun fiyatlı olması, kullanım kolaylığı, korozif olmayışı, depolanabilir oluşu, üretim yüzeylerinde renk ve koku bırakmıyor oluşu gibi kalite özelliklerine sahip olması gerekmektedir (Metin ve Öztürk, 2003; Göktan ve Tunçel, 2014; Kayaardı, 2014). İşletme içinde kullanılan sular ise klor, ozon veya ultrafiltrasyon gibi yöntemler kullanılarak dezenfekte edilmektedir (Metin ve Öztürk, 2003; Casani ve ark., 2005).

Dezenfeksiyon işlemi üretim bitiminde veya üretime başlamadan önce yapılabilir. Doğru durulama işlemi, dezenfeksiyonun üretimden hemen sonra yapılması durumu yüzeylerin zararlanmaması için önemliyken; üretimden hemen önce

yapılan işlemlerde, kalıntının ürüne bulaşabilir olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Tetrapak, 1995, Lowry, 2010).

## **2.2. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Biyofilm Oluşumu ve Quorum Sensing**

Süt ve süt ürünleri üretim hatları yüzeyleri, ham maddenin besin elementleri açısından mikroorganizmaların gelişmesi açısından uygun ortamlardır. Süt ve süt ürünlerinde bozulma ve/veya hastalık etmeni birçok mikroorganizmanın varlığını rapor eden araştırmalar mevcuttur (Koasta ve ark., 2010). Ülkemizde yapılan çalışmalardan çiğ sütün toplam yükünün 6-8 log civarında rapor edildiği görülmektedir (Öksüz,1996; Evrensel ve ark.,2001; Temelli ve ark. 2006; Özder ve Önal, 2007; Kesenkaş ve Akbulut, 2010). Bu nedenle süt üretim hattı, yüzeylerin doğru ve etkin temizlenmemesi durumunda ciddi kontaminasyon kaynağıdır. Yağlı ve besinsel değeri yüksek hammaddenin mikrobiyal yükünün fazlalığı, üretim hattının ve üretim ortamının uygun temizlenmemesi üretim hatlarında mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasına, daha sonrasında biyofilm oluşturarak sürekli bir mikrobiyal kontaminasyona sebep olmaktadır.

### **2.2.1. Biyofilm Tanımı, Mekanizması ve Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar**

#### **2.2.1.1. Biyofilm Tanımı**

Biyofilm; üç boyutlu, ekzopolisakkarit (EPS) ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapıdır (Kumar ve Anand, 1998; Salo ve ark., 2005; Öner ve Ölmez, 2006; Gün ve Ekinci, 2007; Mariana ve ark., 2009; O'Toole, 2011; Magesh ve ark., 2013). Değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak da tanımlanabileceği gibi, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesi olarak da tanımlanmaktadır (Kumar ve Anand, 1998; Gün ve Ekinci, 2009; Mariana ve ark., 2009; Laurenço ve ark., 2011).

#### **2.2.1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları**

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. Mikroorganizmalar çevrede planktonik (bireysel, serbest olarak) olarak veya sesil (yerleşik) olarak bulunmaktadır. Planktonik hücreler bireysel olarak serbest yaşarlar. Yerleşik hücreler ise bir yüzeye tutunur ve bir araya

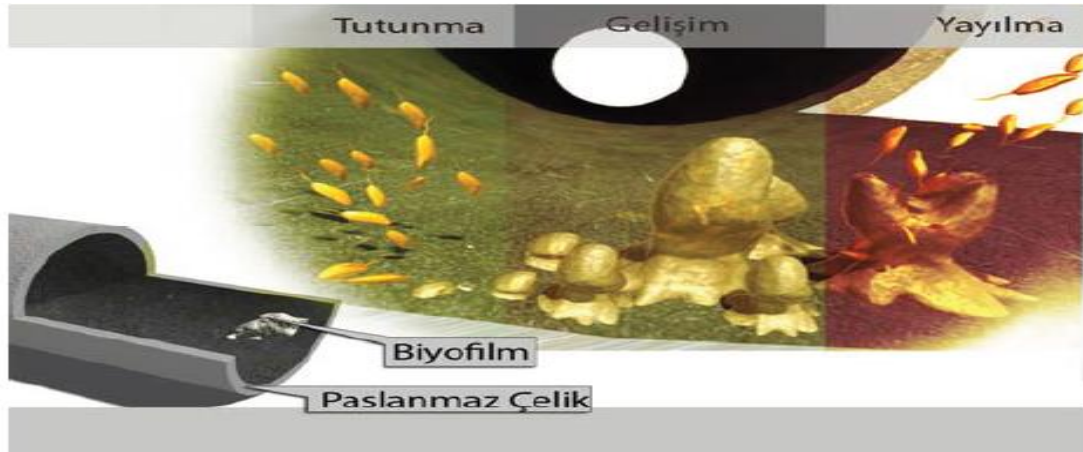
gelerek topluluk halinde fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bakterilerin yüzeye tutunmaları zamana bağlı bir oluşumdur ve bu durum dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki basamakta incelenebilir (Kumar ve Anand, 1998; Poulsen, 1999; Mariana ve ark., 2009).

Dönüşümlü tutunma aşamasında; mikroorganizma yüzey ile tam olarak temas halinde değildir. Yüzeyin yakınındadır. Ancak uzun mesafede elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri ile zayıf etkileşim içindedir. Bu aşamada basit durulama işlemiyle bile ortamdaki uzaklaştırılabilir (Costerton ve ark., 1995; Poulsen, 1999; Lindsay ve Von Holy, 2006). Dönüşümsüz tutunma aşamasında ise mikroorganizma ile yüzey arasında kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır. Flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (Ekinci ve Gün, 2009). Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde Biyofilm Birleşmiş Protein Yapısı (BAP-Biyofilm associated protein)'ını oluşturmaktadırlar. Bu yapı ile birlikte, organizmanın yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının yolu açılmaktadır (Vanholt ve Michiels, 2005; Lasa ve ark., 2006). Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir. Dönüşümsüz basamakta, hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir (Lasa ve ark., 2006; Lindsay ve Von Holy, 2006; Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilm oluşumunun son aşaması koloni oluşumudur. Bir yandan tutunan bakteriler gelişip çoğalırken diğer yanda EPS diğer serbest-sesil (planktonik) bakterilerinde yüzeye tutunmasını sağlar. Bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni) (Poulsen, 1999; Lindsay ve Von Holy, 2006; Salo ve ark., 2006; Gün ve Ekinci, 2009; Karakaya ve ark., 2012). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür. Daha sonraki evrede ise, mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (Poulsen, 1999; Vanholt ve Michiels, 2005; Gün ve Ekinci, 2009). Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Poulsen, 1999; Kumar ve Anand, 1998).

Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin

etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu olabilir (Poulsen,1999; Gün ve Ekinci, 2009).



Şekil 2.3. Bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturma aşamaları (Gün ve Ekinci, 2009)

### 2.2.1.3. Mikroorganizmalara Sağladığı Yararlar

Biyofilm içinde yaşam mikroorganizmalar için daha olumlu şartlar getirdiğinden biyofilm oluşumu bu canlılar için bir tercih nedenidir. Mikroorganizmalar biyofilm yapısı içerisinde olduklarında çeşitli antimikrobiallere, antiseptik ve endüstriyel biositlere karşı daha dirençli bir konumdadır. Biyofilm içindeki bakterilerin planktonik hallerine göre 10-1000 kat daha dirençli oldukları belirtilmektedir (Douglas, 2003). Biyofilmin matris yapısı fiziksel güçler ve dezenfektanlara karşı mikroorganizmaları koruduğu gibi küçük moleküllerin biyofilm yapısı içine difüzyonunu da yavaşlatarak bütünlüğünü mükemmel bir şekilde korumaktadır (Ölmez, 2009). Dönüşümsüz tutunma ve sonrası aşamalarda artık fırçalama ve kazıma ile bile uzaklaştırılmayabilmektedir. Bu yapı içerisinde; farklı besinsel gereksinimlere sahip birçok mikroorganizma bir arada bulunabilmektedir. Bu yakınlık nedeniyle biyofilm içerisinde genetik materyal transferi de gerçekleşebilmektedir (Ekinci ve Gün, 2009; Ölmez, 2009; Shi and Zhu, 2009; Høiby ve ark., 2010; Simoes ve ark., 2010).

### 2.2.2. Quorum Sensing ve Biyofilm Oluşumuna Katkısı, Antiquorum Sensing

#### 2.2.2.1. Quorum Sensing

Quorum sensing ise mikroorganizmalar arası kimyasal iletişim sistemidir. Mikroorganizmalar bu sistemi kullanarak çevrelerindeki mikroorganizmaların yoğunluğunu belirlemektedir (Gün ve Ekinci, 2009; Federle ve Bassler, 2017). QS sinyalleri genetik bir

düzenleme mekanizması olup, bilinen ilk örneği “biyoluminesans” (bakterilerde ışık oluşumu)’dır. Quorum sensing kullanan mikroorganizmalar kendi çevresini izlemekte, populasyon yoğunluğu hakkında bilgi almakta ve gerektiğinde hedef gen bölgesini belirlemek için kullanılmaktadır. Sonuçta populasyonun fizyolojisi ve davranışlarında birçok değişiklik yapılabilmektedir (Karaboz ve Sukatar, 2004; Federle ve Bassler, 2017).

Fuga ve ark. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada bakterilerin bu sistemi; antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, önemli virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde kullandığı bildirilmiştir. Ayrıca ortak yaşam, hareketlilik ve sporulasyon özelliklerinin ortaya çıkışı için de yine quorum sensing’in kullanıldığı belirtilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009). Bassler (2002)’ye göre ise Biyoluminesans oluşumu, biyofilm oluşumu, virulans faktör üretimi, spor üretimi ve üreme quorum sensing sinyalleri ile düzenlenmektedir.

#### **2.2.2.2. Quorum Sensing Sinyal Molekülleri**

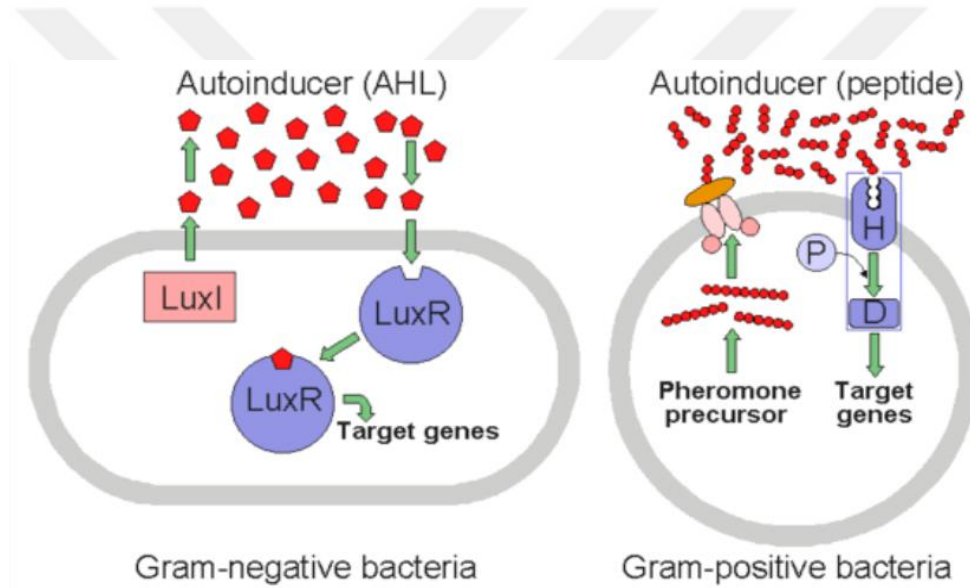
“Quorum sensing” sistemi içinde en önemli rolü hücreler arası sinyal molekülleri üstlenmektedir. Mikroorganizmalar sinyal moleküllerini ortama salarak diğer mikroorganizmalar ile bu sinyal molekülleri vasıtasıyla kimyasal bir iletişime geçmektedirler. Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar kendi aralarında veya birbirleri ile iletişim kurabilmektedir. Buna ek olarak; aynı tür veya farklı türler arasında sinyal molekülleri ile etkileşim olabildiği gibi farklı cinsler arasında da pozitif veya negatif yönde etkileşim olduğu gözlenmiştir (Bassler, 2002; Gün ve Ekinci, 2009; Tınaz, 2012).

Quorum sensing haberleşme sisteminde üç farklı tipte sinyal molekülü kullanılmaktadır. Gram negatif bakteriler Lux I/LuxR üretici-reseptör sistemini kullanarak Acil-homoserin lakton (AHL)’u sinyal molekülü olarak kullanmaktadır. Gram pozitif mikroorganizmalar ise oligopeptit / iki parçalı reseptör sistemini kullanarak kendini düzenleyici peptitleri (Autoinducer peptides-AIPs) sinyal molekülü olarak kullanmaktadır. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler arası iletişim ise Lux S / AI-2 tipi sistemi kullanarak, otoindüser-2 (Autoinducer-2-AI-2) sinyal molekülü vasıtasıyla sağlanmaktadır (Bassler, 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004; Tınaz, 2012; Federle ve Bassler, 2017).

Gram negatif bakteriler için her bir gram negatif bakteri, kendine özgü bir AHL veya AHL’ler kombinasyonu üretmekte; böylece, sadece kendi bireylerinin tanıyıp yanıt vermesi sağlanmaktadır. Dışarıya difüzyon ile salınan AHL konsantrasyonu, belirli bir eşik düzeye gelince, yine difüzyonla membrandan içeriye girerek sitoplazmik eşleniği olan Lux R proteinine bağlanmaktadır. Oluşan Lux R ve AHL kompleksi özel DNA promotor

elementlerine bağlanarak, hedef genlerin transkripsiyonuna olanak sağlamaktadır (Bassler, 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004; Federle ve Bassler, 2017)

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları, iletişim sisteminde kullanılan otoindükleyici peptitler (AIP) olarak bilinen bu oligopeptitler için geçirgen değildir. Hücreden dış çevreye oligopeptid yapıdaki AIP sinyallerinin taşınması hücre yüzeyindeki taşıyıcılar (prekursör) ile gerçekleşmektedir. AIP sinyalleri 5 ile 7 adet amino asit zincirlerinden oluştuğu bildirilmiştir. Sinyaller hücre dışında eşik değere geldiğinde hücre zarında konumlanan birinci reseptör histidine kinazı aktive etmektedir. Bir sonraki aşamada membran içindeki reseptör fosforlanarak aktiflenmekte ve hedef genlerin transkripsiyonuna olanak sağlamaktadır (Bassler, 1999; Bassler, 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004; Waters and Bassler, 2005; Skandamis and Nychas, 2012; Federle ve Bassler, 2017).



Şekil 2.4. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin QS sistemi (Tınaz, 2012)

Hibrit iletişim sistemi ise Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Bu sisteme AI-1 ve AI-2 sinyallerinin dahil olduğu belirtilmiştir (Bassler, 1999; Waters and Basler, 2005). AI-1 (HAI-1) sinyali bir homoserin lakton türü olup; üretimi Lux I varlığına bağlı değildir, S-adenosylmethionine(SAM) yapısında olan sinyal LuxLM proteini tarafından üretilmektedir. AI-2 sinyalinin ise bir furanosil borat yapısında olduğu belirtilmiştir (Bassler, 2000). Lux S geni birçok bakteri türünde olduğundan, çalışmalarda AI-2 sinyal varlığının araştırılması daha yaygın bir uygulamadır (Federle ve Bassler, 2017). LuxS/AI-2 tarafından düzenlenen davranışlar arasında virülens, hareketlilik, toksin üretimi, antibiyotik üretimi, biyofilm oluşumu, biyoluminesens, vb. pek çok davranışın yer aldığı görülmektedir (Karaboz ve Sukatar, 2004; Federle ve Bassler, 2017).



### 2.2.2.3. Quorum Sensing'in Biyofilm Oluşumuna Katkısı

QS sinyal üretimi mikroorganizmaların üreme eğrisi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle lag ve eksponansiyel faz sonrası durağan fazda olan bir kültürde QS sinyal moleküllerinin etkisi daha kolay gözlemlenebilmektedir (Avcı, 2009). *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu için QS'i kullandığının keşfi ile QS'in biyofilm oluşumundaki rolü araştırılmaya başlanmıştır (Bassler, 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004; Waters ve Bassler, 2005). Yüze tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bakteriler tarafından üretilen QS sinyallerinin lokal konsantrasyonlarının artmakta ve biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmaktadır (Arnold ve Silvers, 2000; Bassler, 1999; Bassler, 2002).

Biyofilm oluşum sürecinde QS molekülleri adezyonda, mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadırlar. Quorum sensing sistemi hasarlı mutant suşlarda oluşan biyofilmler gevşek olmakta, hidrojen peroksit ve nütrofillere daha duyarlı hale gelmektedirler (Shih ve Huang, 2002; Suntharalingam and Cvitkovitch, 2005).

### 2.2.2.4. Antiquorum sensing (Quorum Quenching)

Antiquorum sensing veya "Quorum Quenching" (QQ) hücreler arası iletişimin inhibisyonudur. QQ stratejisi temel olarak üçe ayrılmaktadır: a) QS sinyal inhibisyonu, b) QS reseptörü inhibisyonu, c) QS sinyali biyosentezinin inhibisyonu (Dang ve ark., 2007; Kuyun ve ark., 2009; Eriş, 2011; Skandamis ve Yaşa, 2012; Tan ve ark., 2013; Bai A ve Vittal, 2014; Fetzner, 2015; Lade ve ark., 2014).

QS sinyal inhibisyonunda sinyalin yapısı büyük önem taşımaktadır. Yatest ve ark. (2002) tarafından kısa zincirli AHL'lerin uzun zincirli AHL'lere oranla daha kolay bozulduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Grandclément ve ark., 2015). Yine QS sinyalleri gibi davranan bazı maddeler (kimyasallar ve doğal madde ekstraktları) reseptörlere bağlanarak hücreler arası iletişimi kesmektedir. Özellikle halojene edilmiş furanonlar sinyal gibi davranabilmektedir. Mainfield ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *Delisea pulchra* isimli bir deniz alginden elde edilen halonije edilmiş furanonların (OHHL "-3-(oxohexanoyl)-L-homoserine lactone) AHL sinyali gibi davrandığı, AHL reseptörlerine bağlanan furanonların quorum quenching etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada etil alkolde çözüldürülmüş halonije furanonların AHL üreticisi *Escherichia coli* 'in qs ile gerçekleşen gen ekspresyonunu da azaltarak gelişimini azalttığı belirlenmiştir. Yine *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. ve *Agrobacterium* spp.'e ait bazı bakteri türleri kendileri de sinyal

üreticisi olmasına rağmen sinyal kesici enzimler üretebilmektedir. İlgili türler, diğer rakip mikroorganizmaların sinyallerine antagonistik etki göstermektedir (Dong ve ark., 2007; Grandclément ve ark., 2016). Dong ve ark. (2007) tarafından yapılan derleme çalışmasında *Bacillus thuringiensis*'in AHL-laktonaz enzimi, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1'nin AHL-açılaz enzimi ürettiğinden bahsetmişlerdir. Sio ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada fırsatçı bir insan patojeni olan *P. aeruginosa* PAO1'in N-acyl-homoserine lactone (AHL)'den bağımsız quorum sensing sistemi kullanmasının nedeni araştırılmıştır. Çalışmada bakteride bulunan PA2385 genin AHL-açılaz enzimi üretimini sağladığı ve bu enzimin birçok AHL türü üzerine quorum quenching etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Konakçıların (insan, tavşan, fare, at, koyun, inek gibi memeliler) hücrelerinde ve bağışıklık sistemlerinde doğal olarak bulunan paraoksonaz enzimleri nedeniyle QS sinyalleri parçalanabildiği belirtilmiştir. AI-2-kinaz enzimi ise *Escherichia coli* ve diğer enterik bakteriler tarafından üretilmektedir (Fetzner, 2015).

Yine enzim, kimyasalların ve doğal ekstraktlarının QS reseptörlerine bağlanarak inhibisyonunu sağladığı da belirtilmiştir (Dong ve ark., 2007; Eriş, 2011; Grandclément ve ark., 2016). Abolghait ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada inek ve deve sütünün *Cromobacterium violaceum* tarafından üretilen kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada her iki süt türünün de AHL sinyallerini inhibe edebildiği belirtilirken; inek sütünün yağ içeriği nedeniyle AHL inhibisyon değerinin deve sütüne oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Almasoud ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise su ile hazırlanan %4 oranında hazırlanan laktik asit ve malik asit solüsyonlarının AI-2 sinyali üreticisi *Escherichia coli* ve *Salmonella* Typhimurium gelişimini %80 oranında azaltabildiği tespit edilmiştir. Bakteriofajlar ise QS sinyali oluşumuna sebep olan genlerin aktivitesini engellemek için kullanılmaktadır (Patterson ve ark., 2016; Hoque ve ark., 2016). Patterson ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Serratia* spp.'e ait QS sinyali oluşumundan sorumlu CRISPR-Cas sistemi bakteriofaj kullanılarak inhibe edilmiştir. Hoque ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise Gram pozitif bir bakteri olan *Vibrio cholerae*'nin QS sinyalleri olan CAI-1 ve AI-2 sinyallerinin üretiminden sorumlu genler avcı bakteriofajlar tarafından inhibe edilmiştir.

#### **2.2.2.4.1. Doğal Ekstraktların Antiquorum sensing Etkisi**

Doğal ürünlerin iyileştirici etkisi tarih boyunca bilinmekte ve geleneksel yöntemlerde insan ve hayvanların iyileştirilmesi için kullanıldığı bilinmektedir (Burt, 2004; Koh ve ark., 2013). Doğal ürünlerin iyileştirici etkisinin kökeninde mikroorganizmaların bulunduğu

ekolojik denge içinde yetişmeleri, insan ve hayvan başışıklık sistemince tanınmaları ve başışıklık sistemini mikroorganizmalar için uyarıcı olmalarının bulunduğu düşünölmektedir. Bitkiler yetiştikleri ekosistemde mikroorganizmalar ve onları oluşturduğu sinyaller ile karşılaşmakta ve kendilerini bu mikroorganizmalardan korumak için quorum sensing sinyallerinin benzerlerini üretebilmektedir. Bu nedenlerle doğal maddelerin quorum sensing sinyali üreticisi mikroorganizmaların sinyalleri üzerine de etkili olabileceği fikrine varılmıştır (Koh ve ark., 2013). Doğal maddelerin ekstraktlarının quorum quenching etkilerinin varlığı literatür de belirtilmiştir. Bu ekstraktların quorum quenching etkiyi quorum sensing sinyalleri gibi davranarak ve sinyallerin bağlandığı reseptörleri parçalayarak sağladığı bildirilmiştir (Dong ve ark., 2007; Eriş, 2011; Kalia, 2012; Grandclément ve ark., 2016).

Burt (2004) tarafından yapılan çalışmada *Thymus vulgaris*, *Camellia sinensis* ve curcumin esansiyel yağlarının bazı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkileri derlenmiştir. *Thymus vulgaris*'in *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* ve *Eshcherichia coli* üzerine; *Camellia sinensis*'in *E. coli*, *S. aureus*, *Shigella dysenteria* ve *Bacillus cereus* üzerine; curcuminin ise *E. coli* ve *B. cereus* üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu vurgulanmıştır. Mihalik ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada ise *Camellia sinensis*'in su ile hazırlanan ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* PAO1'in AHL sinyalleri üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edilirken; *Camellia sinensis* ekstraktının sinyal gibi davranarak sinyal reseptörlerine bağlandığını belirlemişlerdir.

Nagy (2010) tarafından yapılan çalışmada *Panax ginseng* ve *Thymus vulgaris*'in kısa zincirli AHL sinyallerini inhibe edildiği tespit edilirken; *Panax ginseng*'in başışıklık sistemi üzerine etkili olduğu ve kanseri önleyici olduğu, *Thymus vulgaris*'in soğuk algınlığı üzerine iyileştirici etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada ayrıca *Thymus vulgaris*'in bakteriler, virüsler ve küf-mayalar üzerine antimikrobiyal etkinliği de vurgulanmıştır. Song ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada su ile hazırlanan Çin *Panax ginseng*'in *P. aeruginosa* PAO1'in AHL sinyalleri üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edilirken; biyofilm oluşumu için önemli bir faktör olan ekzopolisakkarit (EPS) olumunu azalttığı belirlenmiştir. Çalışmada Çin *Panax ginseng*'in bakterilerin virölens faktörleri üzerine inhibe edici bir etkisinin bulunmadığı da belirtilmiştir. Queve ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise %95 etil alkol ile hazırlanmış *Sambicus nigra*, *Cichorium intybus* ve *Hypericum perforatum*'un ekstraktlarının MRSA dirençli *S.aureus*'un üzerinde

antimikrobiyal ve quorum quenching etkilerinin olmadığı; fakat bakterinin toksin gelişimini inhibe edebildikleri tespit edilmiştir.

Alvarez ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan propolis ve resveratrol ekstraktlarının *Chromobacterium violeceum* AHL sinyalleri üzerine quorum quenching etkisi yanısıra; *L. monocytogenes* ve *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Çalışmada doğal madde ekstraktlarının *Chromobacterium violeceum* AHL sinyalleri üzerine quorum quenching etkileri ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Yılmaz (2012) boraksın su ile hazırlanan ekstraktının *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter septicus* üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Koh ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada vanilin, *Prunella vulgaris*, *Panax ginseng*, *Thymus vulgaris*, curcumin ve *Genoderma lucium*'un quorum quenching ve antimikrobiyal etkileri derlenmiştir. Çalışmada tüm doğal madde ekstraktlarının *C. violaceum* CV026 AHL sinyallerini inhibe edici özelliğinin bulunduğu belirtilmiştir. *Thymus vulgaris* ve curcumin ekstraktlarının *E. coli* O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir. Mahmood ve Mahmood (2013) tarafından yapılan çalışmada *Panax ginseng*, *Thymus vulgaris*, curcumin, *Camellia sinensis* ve *Calendula officinalis* esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkinlikleri derlenmiştir. Çalışmada *Panax ginseng* esansiyel yağlarının *E.coli*, *Sporothrix schenckii*, *Staphylococcus* sp. ve *Thychophyton*; *Thymus vulgaris* esansiyel yağlarının *Vibrio parahaemolyticus*, *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve virusler; curcumin esansiyel yağlarının *E.coli*, *Vibrio cholera*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis*; *Camellia sinensis* esansiyel yağlarının *Shigella* sp., *Vibrio* sp., *Streptococcus mutans* ve virüsler; *Calendula officinalis* esansiyel yağlarının *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes* ve *Agrobacterium tumefaciens* üzerinde antimikrobiyal etkisinin bulunduğu belirtilmiştir.

Chang ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada curcuminin DMSO ile hazırlanan ekstraktının *C.violaceum* CV026 AHL sinyallerini inhibe edici özelliğinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Tolmacheva ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise *Calendula officinalis*'ın %45 etil alkolle hazırlanan ekstraktının *C.violaceum* CV026 AHL sinyallerini inhibe edici özelliğinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Nam ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Vanilla planifolia*'nın saf su ile hazırlanan ekstraktının *C.violaceum* CV026 AHL sinyallerini inhibe edici özelliğinin bulunduğu tespit edilmiş; membrane biyoreaktör yüzeylerinde görülen biyofilm oluşumu için önemli bir faktör olan EPS'yi yaklaşık %10 oranında azaltabilmiştir. Lade ve ark. (2015)

tarafından yapılan bir çalışmada Epigallocatechin gallat (EGCG) ve curcuminin DMSO ile hazırlanan ekstraktının yanısıra bu iki doğal ekstraktının bazı mikroorganizmaların biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Çalışmada genel itibari ile EGCG ekstraktını *Pseudomonas* spp'nin biyofilm oluşumunu %62, *Enterobacteriaceae* ailesinden bakterilerin biyofilm oluşumunu ise ortalama olarak %65 oranında azalttığı belirtilmiştir. Curcumin ekstraktının kullanımı durumunda bu oranlar %53 ve %60 olarak gerçekleşmiştir. Her iki madde ekstraktının kombinasyonu çalışması sonucunda ise bu oranlar ortalama olarak her iki mikroorganizma için de %97 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar doğal madde ekstraktlarının kısa ve uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine quorum quenching etkilerinin de incelemiştir. Çalışma sonucunda EGCG ve kombinasyon ekstraktlarının her iki tür AHL sinyali üzerinde inhibe edici etkisi görülürken; curcuminin ekstraktının sadece kısa zincirli AHL sinyallerini inhibe edici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Del Monte ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ise *Hypericum perforatum*'un 9:1 oranında kloroform ve metanol karışımı kullanılarak hazırlanmış ekstraktının *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *B.cereus* ve *Chronobacter sakazakii* üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Serra ve ark. (2016) yeşil çaydan ekstrakte edilen EGCG'nin *E.coli*'nin biyofilm oluşumunu sadece quorum sensing sinyal inhibisyonu dışında hücre içine geçerek, biyofilm oluşumunda sorumlu geni etkilediğini tespit etmişlerdir. Çalışmada bu geni etkilenmesi ile bakterinin EPS ve fibril gelişiminin azaldığı tespit edilirken; yine bakterinin shiga toksin üretimini de inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise EGCG kullanılarak "ProtecTeaV" isimli bir dezenfektan madde hazırlanmıştır. Çalışmada bu dezenfektanın Poliovirüs 1 (PV1) isimli virüsü %50 oranında inhibe ettiği görülürken; madde güçlü antiseptik ve virüsidal olarak tanımlanmıştır.

Son olarak Lade ve ark. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada membran biyoreaktörlerde biyofilm oluşumunu engellemek için yine DMSO ile hazırlanan curcuminin ekstraktı kullanılmıştır. Çalışmada doğal madde ekstraktının yalnızca kısa zincirli AHL sinyallerini inhibe ettiği; buna karşılık membranda biyofilm oluşumunu %82 oranında azaltabildiği bildirilmiştir.

### **2.2.3. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Kullanılan Yüzeyler, Korozyon ve Biyofilm Oluşumu ile İlgisi**

#### **2.2.3.1. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Hatlarında Kullanılan Yüzeyler**

Süt ve süt ürünleri üretim hatlarında ve alanlarında genel itibari ile paslanmaz çelik yüzeyler, gıdaya uygun plastik yüzeyler, cendere bezinin yapıldığı Amerikan bezi yüzeyi ve

Üretim alanın yer-duvar döşemesi olan seramik yüzeyler bulunmaktadır. Çiğ süt tankları, pastörizasyon nitesi, balans tankı, salamura tankı, Bulgar tekneleri, bıçaklar ve taşıyıcı borular üretim hattında bulunan paslanmaz elik yüzeylerdir. Maya maşrapası ve kimi işletmelerde pastörize sütün Bulgar teknelerine aktarılmasında kullanılan borular plastik yzeylerken; cendere bezi sık dokulu ve kolay parçalanmayan bir bez yüzeydir. Üretim alanlarında duvar, yer ve drenajlar ise aside dayanıklı seramik yüzeylerdir. Gıda sanayisi için paslanmaz elik yüzeyler dışındaki seramik, tekstil ve plastik yüzeyler için korozyon söz konusu değildir; fakat bu yüzeylerin kullanılan kimyasallara dayanıklı olması, gıdaya istenmeyen madde (toksin ve renk gibi) migrasyonuna neden olmayacak maddelerden seçilmesi esastır (Selby, 1955; Van Hout ve Michiels, 2010).

Süt doğal yapısı nedeniyle asitliği yüksek olmayan içinde yağ gibi hidrofobik maddelerin yanı sıra su gibi hidrofilik maddeler içeren bir hammaddedir (Tetrapak, 1995). Paslanmaz elik ise süt içeriğinde bulunan laktik aside oldukça dayanıklı, ürüne koku ve renk geçişine sebep olmayan, kolay temizlenebilir bir ürün olduğundan üretim hatlarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Salas ve ark., 2012; Cvetkovski, 2012). Süt ve süt ürünleri üretim hatlarında genel itibari ile paslanmaz elik 304, 304 L ve 316, 316 L tipleri kullanılmaktadır. Paslanmaz elik 316 içerdiği molibden nedeniyle korozyona daha dayanıklıdır. Bu nedenle paslanmaz elik 316 kullanımı tercih edilmektedir (Flint ve ark., 2000; Julien ve ark., 2002; Barbosa ve Costa, 2005; Ferreira ve ark., 2013; Singh ve Kumar, 2014). Paslanmaz elik 304, 304 L ve 316, 316 L'nın içerikleri izelge 2.1'de görülebilmektedir (Martin ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014; Nan ve ark., 2016; Verna ve ark., 2016).

Çizelge 2.1. Paslanmaz çelik (SS) 304, 304 L ve 316, 316 L içerikleri (% ağırlık)

| SS Tipi | C     | Ni    | Mn   | P     | Cr    | Mo   | Sn    | Cu   | N     | Si    | Al    | Cb    | Fe    |
|---------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 304     | 0,028 | 10,12 | -    | -     | 18,39 | -    | -     | -    | -     | 0,052 | -     | -     | 71,41 |
| 304 L   | 0,018 | 10,14 | 1,72 | -     | 18,68 | 0,35 | -     | 0,5  | 0,072 | -     | -     | -     | 68,52 |
| 316     | 0,08  | 9,86  | 0,44 | 0,009 | 16,67 | 2,09 | 0,013 | 0,49 | 0,10  | 0,019 | -     | -     | 70,23 |
| 316 L   | 0,028 | 10,2  | 1,24 | -     | 16,62 | 2,14 | -     | 0,3  | -     | 0,282 | 0,008 | 0,063 | 69,12 |

### 2.2.3.2. Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Korozyon

Süt ve süt ürünleri üretim hatlarında korozyon, hammaddenin yapısından çok temizlik için kullanılan kimyasal maddeler nedeniyle oluşmaktadır (Selby, 1955; Cvetkovski, 2012). Gıda endüstrisinde görülen başlıca paslanmaz çelik korozyon tipleri çatlak korozyon, çukurcuk korozyon, stres kırığı korozyon, taneler arası korozyon, galvanik korozyon ve mikrobiyal korozyon olmak üzere altı adettir (Cvetkovski, 2012; Salas ve ark., 2012).

Çatlak korozyon, paslanmaz çelik yüzeyin üstünde oluşturulan pasif tabakanın parçalanması ile çelik yüzeyde çatlakların oluştuğu, çelik materyalinden bazı iyonların serbest kalabildiği bir korozyon tipidir. Çatlak korozyon daha çok içinde klor iyonu taşıyan sıvılar ile oluşmaktadır (Çetin, 2007; Cvetkovski, 2012).

Çukurcuk korozyon ise yüzeyde lokal ve derin çukurların oluştuğu bir korozyon türüdür. Başlangıçta pasif tabaka üzerinde açılan çukurlar zaman içerisinde çelik yüzeye kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle zaman içerisinde yüzeye oldukça zarar verebileceğinden önemli görülmektedir. Stres korozyon, stres ve korozif çevresel özellikler nedeniyle çelik yüzeyinde kırıkların oluşumu ile karakterize edilir. Bu tip korozyon genellikle 50°C'nin üzerinde klorür uygulamaları sonucunda görülmektedir. Boru hattı, tanklar ve su taşıma sistemlerinde stres korozyon görülmektedir (Çetin, 2007; Cvetkovski, 2012).

Taneler arası korozyon, ısıdan etkilenen alanlarda görülen dar band, lokal kırık korozyon olarak tanımlanmaktadır. Bu tip korozyon daha çok standart karbon içeren östenitik paslanmaz çeliklerde görülmektedir. Östenitik paslanmaz çelikler %16-26 Cr ve %7-22 Ni içeren, kolaylıkla şekillenebilen, kaynak kabiliyetleri iyi ve oksidasyon dirençleri

yüksek tipte paslanmaz çeliklerdir. Süt endüstrisinde sıklıkla kullanılan 304 ve 316 tipleri östenitik paslanmaz çelikler sınıfındadır. Taneler arası korozyonun çelik yüzeylerde görülmemesi için düşük karbon içermeleri (en fazla %0,030) gerekmektedir (Çetin, 2007; Akdoğan-Eker, 2009; Cvetkovski, 2012).

Galvanik korozyon iki farklı ve bağlantılı materyalin aynı iyonik sıvıya maruz kalması durumunda elektiriksel bir iletişim olması nedeniyle birinin korozyona uğraması şeklinde gerçekleşir. Bu tip korozyon daha çok paslanmaz çelik boruların alüminyum bağlantı elemanları ile bağlandığı durumlarda, bağlantı elemanının korozyona uğraması şeklinde gerçekleşmektedir (Çetin, 2007; Akdoğan-Eker, 2009; Cvetkovski, 2012).

Mikrobiyal korozyon ise paslanmaz çelik yüzeylere yapışarak; yerleşen mikroorganizmaların metabolize ederek ortaya çıkardığı yan ürünler nedeniyle gerçekleşen bir korozyon türüdür. Mikroorganizmalar bu tür korozyonu yüzeye yapışarak; biyofilm oluşumu, ekzopolisakkaritler gibi yapışkan yapılar oluşumu, çelik yüzeylerdeki bazı iyonların kullanımı, ortam asitliliğinin değişimine katkı yaparak, yüzey koruyucu kimyasalların parçalanması ve var olan korozyon reaksiyonunda katalizör etki gösterme gibi nedenler gerçekleştirebilmektedir. Örneğin *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfoarculus*, *Desulfobacter* ve *Desulfotignum* spp. gibi sülfat indirgeyen bakteri türlerinin düşük alaşımlı çeliklerde demir konsantrasyonunu etkileyerek korozyona sebep olduğu bildirilmiştir (Beech ve Sunner, 2004; Çetin, 2007; Salas, 2012; San ve ark., 2013).

### **2.2.3.3. Paslanmaz Çelik Yüzey Korozyonunun Biyofilm Oluşumuna Etkisi**

Gıda endüstrisinde kullanılan çelik yüzeylerde biyofilm ve korozyon oluşumu birbiri üzerine sinerjistik etkisi olan iki faktördür (Beech ve Sunner, 2004). Bellon-Fontaine ve ark. (1990) tarafından paslanmaz çeliğin topoğrafyası ve yüzeyinin fizikokimyasal yapısının bakterilerin bu yüzlere yapışma oranlarını değiştirdiği bildirilmiştir. Başta bakteriler olmak üzere mikroorganizmalar hidrofilik bir yapı sergilemektedir. Beech ve Sunner (2004), korozyon sırasında yüzeylerin oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin değiştiğini vurgulamış; bu durumun mikroorganizmaların yüzeylere yapışabilmesi ve yerleşebilmesi üzerine etkili olduğu savunulmuştur. Hidrofilik yapı sergileyen paslanmaz çelik yüzeylerden yine hidrofilik ürünlerin işlenmesi durumunda hidrofilik mikroorganizmaları yüzeylere yapışma oranı artmaktadır (Flint ve ark., 2000). Yine yüzeylerin pürüzlülüğünün biyofilm oluşturacak planktonik hücrenin yüzeye yapışmasında büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Ammar ve ark., 2015). Flint ve ark. (2000) ve Jullien ve ark. (2002) yaptığı çalışmalarda pasifize edilmiş ve/veya temizlik uygulanmış paslanmaz çelik yüzeylerin son



derece pürüzlü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kimyasal korozyonuna uğrayan paslanmaz çelik yüzeyler de biyofilm oluşumuna destek olacak şekilde daha pürüzlüdür (Aruliah ve Ting, 2014; Klämpfl ve ark., 2014; Bozorg ve ark., 2016).

Bakteriyel biyofilm oluşumu paslanmaz çelik yüzeylerin üzerinde pasifizasyon sonucu oluşan metal oksit tabakada gerçekleşmektedir (Kruszewski ve ark., 2013). Biyofilmler, kompleks yapısı içinde bulunan hücre dışı ürünler, inorganik ve organik atıkların passivize paslanmaz çelik yüzey ile etkileşim haline girerek korozyonun ilerlemesine, üründe mikrobiyal kontaminasyona, kokuya ve renk değişimlerine sebep olmaktadır (Beech ve Sunner, 2004; Seyeux ve ark., 2015).

Kruszewski ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada hiç bir muameleye maruz bırakılmamış paslanmaz çelik 316 L ile oktadesilfosfonik asit ile muamele edilmiş paslanmaz çelik 316 L yüzelerde biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* hücre miktarları tespit edilmiştir. Çalışmada ilk 2 saatte yüzeylerde biyofilm oluşturan hücre miktarları sırası ile 8,03 ve 7,51 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilirken; 24 saat sonunda bu sayı 4,03 ve 5,63 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. Seyeux ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise piyasada bulunan paslanmaz çelik 316 L ile Cr (krom) oranı arttırılarak modifiye edilmiş paslanmaz çelik 316 L pasivizasyon sonrası *Esherichia coli* ile muamele edilmiş ve 1 saatte yapışan bakteri hücre miktarı elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir. Çalışmada her bir çelik plaka yüzeyinden 10 farklı görüntü alınmış ve yapışan hücre miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. 1 saat sonucunda paslanmaz çelik 316 L yüzeyinin %20'sinin bakteri hücreleri ile kaplandığı görülmüş; modifiye paslanmaz çelik 316 L yüzeyinin hemen aynı oranda bakteri hücresi ile kaplandığı tespit edilmiştir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Araştırma Planı

Araştırmamız birbirini takip eden dört çalışma şeklinde planlanmıştır. İş planı ekte gösterilmiştir (Ek 1). Birinci çalışmada, Ezine yöresinde faaliyet gösteren üç farklı Ezine peyniri üreticisinin üretim hattından ve ortamdaki örnekler alınmış, mikrobiyal yükler belirlenmiş ve izolatlar alınmıştır. Bu izolatlar fenotipik olarak tanımlanmış ve biyofilm oluşturma kapasiteleri iki farklı yöntem ile belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma potansiyeli olan izolatların biyofilm oluşumu için önemli bir faktör olan iletişim sinyalleri (quorum sensing) tespit edilmiştir.

İkinci çalışma kapsamında üretim hatlarından ve alanlarından izole edilmiş olan biyofilm pozitif izolatlar üzerine etkili olabilecek doğal, antibiyofilm ve quorum quenching maddeler belirlenmeye çalışılmıştır. Biyofilm pozitif izolatlar üzerine antimikrobiyal etki gösteren maddelerin antibiyofilm potansiyelleri olduğu kabul edilmiş, AHL ve AI-2 iletişim sinyallerini kesebilme durumları incelenmiştir. Hem antibiyofilm hem quorum quenching (iletişim sinyallerini inhibe edici) özellik taşıyan maddelerin MİK, MBK ve % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

Üçüncü çalışmada ise antibiyofilm ve quorum quenching etkisi olan doğal maddelerin ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarının seçilen izolatlar üzerine antimikrobiyal etkisi ile birlikte % inhibisyon değerleri tespit edilmiştir.

Çalışmanın son bölümünde ise, ilk çalışmada temizlik öncesi ve temizlik sonrası yüzey yükleri belirlenerek temizlik prosedürlerinin etkinliği belirlenmiş olan firma B'nin CIP prosedürü birebir kullanılmıştır. Laboratuvar ortamında paslanmaz çelik 316 L'den üretilen plakalar üzerinde gerçek süt ortamında geliştirilen biyofilm pozitif izolat geliştirilmiştir. Üzerinde 24 saat boyunca mikroorganizma geliştirilmiş çelik plaka yüzeyleri üzerine CIP sisteminin, firma tarafından kullanılan ticari dezenfektanın ve tarafımızdan geliştirilen doğal dezenfektan formüllerinin etkileri araştırılmıştır. Etkilerin araştırılması sırasında CIP prosedürünün, ticari dezenfektan ve doğal dezenfektan formüllerini çelik plaka sesil ve biyofilm oluşturan hücrelerini azaltma miktarı, çelik plakalar üzerine korozif olma durumları konusunda tespitler yapılmıştır.

Her çalışmada kullanılan materyal ve metot ayrı ayrı belirtilmiştir.

## **3.2. Çalışma 1. Peynir Üretim Hatlarının Mikrobiyolojik Yükünün Belirlenmesi, İzolatların Alınması, Tanımlanması, Biyofilm Kapasitesinin ve Quorum Sensing Sinyal Varlığının Belirlenmesi**

### **3.2.1. Yüzey Örnekleme**

Bu çalışma kapsamında Ezine peyniri üretimi yapan üç farklı işletmenin hattından firmaların teknik elemanları ile birlikte yapılan tehlike analizi sonucu örnekleme noktaları belirlenmiştir (su, çiğ süt tankı, balans, çelik boru, plastik boru, Bulgar teknesi, cendere bezi, teleme kırma bıçağı, üretim bıçağı, maya maşrapası, duvar, drenaj, üretim havası, dolun havası, üretim personeli, dolun personeli, salamura teknesi). Üç farklı firmadan belirlenen ortak noktalardan üç farklı mevsimde (Nisan 2015-Ekim 2015 arasında) üç defa, iki paralel olarak örnek alınmıştır. Ayrıca bir firma üretim hattından bir örnek alım periyodunda CIP öncesi ve sonrası örnek alınarak; CIP'in etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

### **3.2.2. Kültürler**

Quorum sensing varlığı ve quorum quenching (iletişim sinyal inhibisyonu) çalışmalarında indikatör olarak kullanılan *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136 ve *Vibrio harveyi* BB 170 bakteri kültürleri Prof.Dr. Ji Hyang Kweon ve Dr. Hashade Lade tarafından Konkuk Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Seul, Güney Kore'den sağlanmıştır.

### **3.2.3. Yöntem**

#### **3.2.3.1. Yüzey, Su ve Hava Örneklerinin Alınması**

Belirlenen yüzeylerden örnekler, 10 mL %0,1'lik peptonlu su (Merck 107228, Almanya) ile ıslatılan steril swap çubukları ile 100 cm<sup>2</sup>'lik alandan sürüntü şeklinde alınmıştır. Üretim ve dolun personeli örnekleri, üç dönemlik örnekleme süresince aynı personelin her iki elinden alınmıştır. İşletme içinde kullanılan sudan alınan örnekler, klorlama ihtimaline karşı içine %0,1'lik sodyum tiyosülfat (PubChem CID: 24477) içeren 200 mL'lik şişelere alınmıştır (Karapınar, 1994; AOAC, 2000).

Hava örneklerinin alınması için ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nden hava örnekleme cihazı (SKC Biostage-28L/sn., ABD) alınmıştır. Cihazın filtre yüzeyi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilerek kullanılmış; 4 dk. boyunca hava örneği alınmıştır (Rao ve ark., 2012; FDA, 2017).

Hızlı yöntem olarak yüzeyin mikrobiyal yükünün belirlenmesi için kullanılan ATP-Biyoluminesans yönteminde ise ürüne (ATP-Lüminometre PD-10 Kikkoman Co., Japonya)

ait özel swaplar ile örnekler 100 cm<sup>2</sup>'lik alandan sürüntü şeklinde alınmıştır (Ayçiçek ve ark., 2006; İpek ve Zorba, 2014).

### **3.2.3.2. Test Örneği Hazırlama Metodu**

Yüzeylerden örnekler 100 cm<sup>2</sup>'lik alandan sürüntü şeklinde alınmış; 10 mL %0,1'lik peptonlu su içerisine aktararak homojenize edilmiştir. Daha sonra %0,1 peptonlu su ile uygun desimal dilüsyonlar hazırlanarak mikrobiyolojik ekimlerde kullanılmıştır (AOAC, 2000; Temelli ve ark., 2006; İsmail et.al., 2013).

### **3.2.3.3. Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı (AMB)**

Alınan su ve yüzey örneklerinden hazırlanan her bir dilüsyondan paralel petrilere dökme plak yöntemine göre ekim yapılmış, besiyeri olarak Nutrient Agar (Merck 1.05450, Almanya) kullanılmıştır. 37°C' de 48 ± 2 saat inkübasyon sonrasında 30-300 koloni içeren petrilere sayım yapılarak aerobik mezofilik bakteri sayısı hesaplanmıştır (AOAC, 2000; Maturin ve Peeler, 2001).

Alınan hava örneklerinde ise besiyeri olarak Nutrient Agar (Merck 1.05450, Almanya) kullanılmıştır. 37°C' de 48 ± 2 saat inkübasyon sonrasında petrilere gelişen koloni sayısı belirlenmiştir. Steril Nutrient agar bulunan petri kabı, 28 L/sn. kapasiteli cihaz ile 4 dk. boyunca ortam havası ile karşılaştırıldığından koloni sayısı kob/m<sup>3</sup> haline şeklinde ifade edilmiştir (Graham, 2011; Rao ve ark., 2012; FDA, 2017)

ATP-Biyoluminesans metodu ATP varlığında lüsiferin enzimi ile oksijenin reaksiyonu sonucu biyoluminesans ışığının oluşumunu temel almaktadır. Biyoluminesans ışığının oluşumu ATP kullanımı nedeniyle yüzeyin mikroorganizma yükü (Toplam Canlı Sayısı) bağıl ışık birimi (Relative Light Unit-RLU) olarak verilmektedir. Yüzeyin mikrobiyal yükünün hızlı bir şekilde ortaya konulduğu yöntemde luminometre (ATP-Lüminimetre PD-10 Kikkoman Co., Japonya) kullanılmaktadır. Yüzeylerin kirlilik durumu Ünlütürk ve Turantaş (2002) ve Kikkoman firmasının belirlediği skala kullanılarak belirlenmiştir (Ayçiçek ve ark., 2006; İpek ve Zorba, 2014).

### **3.2.3.4. *Bacillus* spp. Sayımı**

Alınan su ve yüzey örneklerinden hazırlanan her bir dilüsyondan paralel petrilere yayma plak yöntemine göre ekim yapılmış, besiyeri olarak Hicrome *Bacillus* Agar (92325, Sigma-Aldrich, İsviçre) kullanılmıştır. 30°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında 30-300

koloni içeren petrilere sayım yapılarak *Bacillus* spp sayısı belirlenmiştir (Guezennec ve ark., 2015).

### **3.2.3.5. Enterobacteriaceae Sayımı**

Alınan su ve yüzey örneklerinden hazırlanan her bir dilüsyondan paralel petrilere çift tabaka dökme plak yöntemine göre ekim yapılmış, besiyeri olarak Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Merck 110275, Almanya) kullanılmıştır. 35 °C’ de 18-24 saat inkübasyon sonrasında 25-250 koloni içeren petrilere sayım yapılarak *Enterobacteriaceae* sayısı belirlenmiştir (Harrigan, 1998, ISO, 2004).

### **3.2.3.6. Pseudomonas spp. Sayımı**

Alınan su ve yüzey örneklerden hazırlanan her bir dilüsyondan paralel petrilere yayma plak yöntemine göre ekim yapılmış, besiyeri olarak Cephalothin-Sodium Fusidate-Cetrimide Selective Agar-CFC (Merck 1.07620, Almanya) ve CFC Agar katkısı (Merck 107627, Almanya) kullanılmıştır. 30°C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında 30-300 koloni içeren petrilere sayım yapılarak *Pseudomonas* spp sayısı belirlenmiştir (Harrigan, 1998; Morales ve ark., 2016).

### **3.2.3.7. Listeria spp. Sayımı**

Alınan su ve yüzey örneklerinden hazırlanan her bir dilüsyondan paralel petrilere yayma plak yöntemine göre ekim yapılmış, besiyeri olarak Polymyxin-Acridin-Lithium chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol-PALCAM *Listeria* Agar (Merck 1.11755, Almanya) ve PALCAM Agar katkısı (Merck 112122, Almanya) kullanılmıştır. 37°C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında 30-300 koloni içeren petrilere sayım yapılarak *Listeria* spp sayısı belirlenmiştir (Harrigan, 1998; Hitchins ve ark., 2016).

### **3.2.3.8. Bakterilerin Saf Kültür Haline Getirilmesi**

Analizler sonucu elde edilen izolatlar, Nutrient Agar (Merck 1.05450, Almanya) besiyerine çizilerek tek koloni elde edildikten sonra izolatlar, +4 °C’de saklanmıştır. Gram boyama yapılarak; saflık durumları, Gram pozitif veya negatif olma durumları, şekilleri konusunda bilgi edinilmiştir.

Gram boyama sırasında hazırlanan preparatlar önce kristal viyole (PubChem CID: 11057) boyası ile 1 dk, Gram iyot (PubChem CID: 105053) ile 1 dk, etil alkol (PubChem

CID: 702) ile 15 sn. ve safranin (PubChem CID: 2723800) boyası ile 30 sn. muamele edilmiştir (Harrigan, 1998; AOAC, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 2002).

Saf olarak elde edilen kültürlerden *Listeria* spp. olduğu düşünülenler % 4 yeast ekstrakt içeren, Tryptone soy agar (Merck 105458, Almanya) içeren özel bir besiyerinde; diğerleri Nutrient Agarda (Merck 1.05450, Almanya) saklanmıştır (Harrigan, 1998; Hitchins ve ark. 2016).

### **3.2.3.9. API Kitleri ile Fenotipik Olarak Tanımlama**

Saf olarak elde edilen ve Gram reaksiyonu, mikroskop altındaki şekli, oksidaz ve katalaz testi sonuçlarına göre ayrılan izolatların fenotipik olarak tanımlanması için API kitleri (Biomerioux, Fransa) kullanılmıştır. Blood Agarda (Merck 110886, Almanya) geliştirilen *Listeria* spp.'lerinin hemoliz durumları belirlendikten sonra API *Listeria* kiti kullanılarak tanımlanırken; diğerleri Nutrient Agar'da (Merck 105450, Almanya) 24 saatlik kültür hazırlandıktan sonra tanımlama için kullanılan API kitleri (*Pseudomonas* spp. için API 20 NE, *Enterobacteriaceae* için API 20E ve *Bacillus* spp. için API 50 CHB ile tanımlanmıştır. Tanımlamaların doğrulanması için API fenotipik tanımlama yazılımınca talep edilen bazı ek testler yapılmıştır. Bu testler; oksidaz, katalaz, glikozun oksijenli ve oksijensiz kullanımı, Mac Conkey Agar'da üreme, Voges-Proskauer, metil red, karbonhidrat fermantasyonu, hareketlilik ve hemoliz testleridir.

#### **3.2.3.9.1. Oksidaz Testi**

Sitokrom oksidaz, fenilendiamin bileşiklerini okside ederek koyu mavi renkli indofenole dönüştürür. %1'lik tetrametil-p-fenilendiamine (PubChem [CID:8264](#)) filtre kağıtlarına konur, üzerine 1 öze dolusu kültür alınarak 10 sn. içerisindeki renk değişimi incelenir. Rengin mavi olması pozitif sonuç olduğunu göstermektedir (Harrigan, 1998; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Halkman, 2013).

#### **3.2.3.9.2. Katalaz Testi**

Temiz lam üzerine bir öze dolusu kültür iyice karıştırılarak sürülür, üzerine 1 mL %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PubChem [CID:786](#)) eklenir. Gaz kabarcıkları gözlemlenmesi katalaz pozitif olduğunu göstermektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Halkman, 2013; Hitchins ve ark. 2016).

### **3.2.3.9.3. Glikozun Oksijenli ve Oksijensiz Kullanımı**

Elde edilen izolatlardan iki Hugh-Leifson Glucose Broth besiyerine ekim yapılmış, birinin üzerine mineral yağ eklenerek glikozun (PubChem CID: 79025) aerobik ve anaerobik kullanımı araştırılmıştır. 37°C/24 saat'lik inkübasyon sonucu besiyerinin renginin mavimordan sarı renge dönüşümü ve durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif reaksiyon olarak belirlenmiştir (Atlas, 2010; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Halkman, 2013; Hitchins ve ark. 2016).

### **3.2.3.9.4. MacConkey Agar'da Üreme**

*Enterobacteriaceae*'a ait izolatların tanımlanmasında API Kitlerinin önerisi ile MacConkey Agar'a (Merck 1.05465, Almanya) ekilerek üreme durumları tespit edilmiştir (Biomerioux, 2015).

### **3.2.3.9.5. Voges-Proskauer Testi**

Bu test mikroorganizmanın pürivik asitten asetil metil karbinol üretip üretmediğinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Metil Red-Voges Proskauer (Merck 105712, Almanya) besiyerine öze ile ekim yapılarak 37°C/48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası %5'lik alfa-naftol (PubChem [CID:7005](#)) ve %16'lik KOH (PubChem [CID:14797](#)) eklenerek renk değişimi gözlenir. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kabul edilmektedir (AOAC, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Feng ve ark., 2011).

### **3.2.3.9.6. Metil Red Testi**

Metil-Red testi mikroorganizmanın glikozdan karışık asit fermantasyonu ile yüksek oranda asit ürettiğini göstermektedir. Metil Red-Voges Proskauer (Merck 105712, Almanya) besiyerine öze ile ekim yapılarak 37°C/96 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tüpe 5 damla metil red (PubChem CID: 5798639) indikatörü eklenir. Metil kırmızısı ayırıcı pH 6,0 ve üzerinde sarı renk, pH 4,4 ve altında ise kırmızı renk verir. Renk kırmızıya döndüğünde sonuç pozitif olarak alınmaktadır (Harrigan, 1998; AOAC, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Feng ve ark., 2011).

### **3.2.3.9.7. Karbonhidrat Fermantasyonu Testi**

Carbonhydrate Fermentation Broth 2 (Phenol Red Broth Base, Merck 1.10987, Almanya) besiyerine %0,5 oranında çeşitli karbonhidratların (ksiloz, ramnoz, mannitol v.b.) eklenmesi ile yapılan bir testtir. Mikroorganizmanın ilgili kardonhidratı 37°C'de 5 gün

içinde fermente edip edemediği tespit edilmektedir. Besiyerin renginin sarıya dönmesi ve Durham tüpleri içinde gaz oluşumu sonucu pozitif olarak alınmaktadır (Harrigan, 1998; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Feng ve ark., 2011).

#### **3.2.3.9.8. Hareketlilik Testi**

Hareketlilik analizi için mikroorganizmaya uygun bir besiyeri kullanılarak, iğne öze ile tüp içindeki dik besiyerine ekim yapılmıştır. 30°C’de 24 saat’lik inkübasyon sonunda mikroorganizmaların hareketli olup olmadığı incelenmiştir. Ekim yapılan çizgi dışına yanlara doğru üreme olması durumunda bakteri hareketli olarak kabul edilmiştir (Harrigan, 1998; Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Halkman, 2013; Hitchins ve ark. 2016).

#### **3.2.3.9.9. Hemoliz Testi**

Şüpheli *Listeria* spp ve *Streptococcus* spp izolatlarının tanımlanmasında önemli bir unsur olan Kanlı Agarda (Merck 110886, Almanya)  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -hemolitik reaksiyonlarının belirlenmesi için Kanlı Agar’a çizilmişlerdir. Sonuçlar 37°C’de 2-7 gün inkübasyonu sonucunda değerlendirilmiştir. Beta ( $\beta$ ) hemoliz, bakteri kolonisinin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve tamamen şeffaf bir halka ile karakterize edilir. Alfa ( $\alpha$ ) hemoliz, koloni etrafında demirli bileşiklerin oluşturduğu yeşil renkli, tam şeffaf olmayan bir halka şeklinde görülür. Gama ( $\gamma$ ) hemoliz; bakteriler hemolizin enzimine sahip olmadığı için kanlı agarda hemoliz oluşturmaz (Ünlütürk ve Turantaş, 2002; Halkman, 2013; Hitchins ve ark. 2016).

#### **3.2.3.10. *Streptococcus* spp.’nin Fenotipik Tanımlanması**

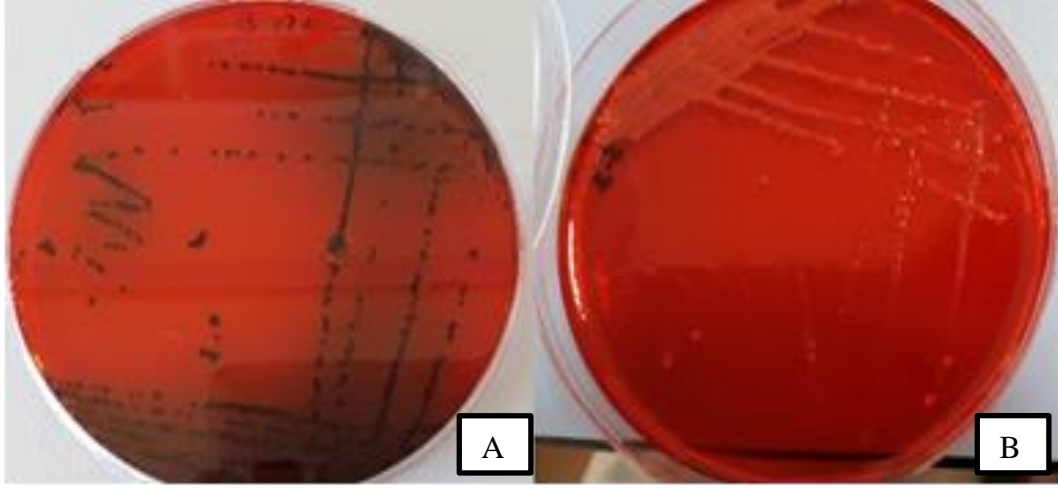
Biyofilm pozitif olduğu belirlenen *Streptococcus* spp. ait izolatlar mikroskop altında incelenmesinin ardından gelişme sıcaklığı, % 6,5 NaCl ve % 40 safra tuzu varlığında gelişme, hemoliz durumu ve kullandığı şekerler (sorboz, melezitoz, riboz) açısından incelenerek fenotipik olarak tanımlanmıştır (Cullimore, 2000; UMS, 2015) (Ek 2).

#### **3.2.3.11. İzolatların Biyofilm Kapasitesinin Belirlenmesi**

##### **3.2.3.11.1. Congo Red Agar Yöntemi ile Belirlenmesi**

Tanımlanan izolatların biyofilm kapasitesinin belirlenmesi için Congo Red Agar yöntemi kullanılmıştır. İçerikten hazırlanan Congo Red Agar’da çizilen izolatların siyah pigment oluşumu sonucunda biyofilm pozitif olduğu kabul edilmiştir (Ek 3) (Şekil 3.1.) (Arciola ve ark., 2002; Mariana ve ark., 2009).

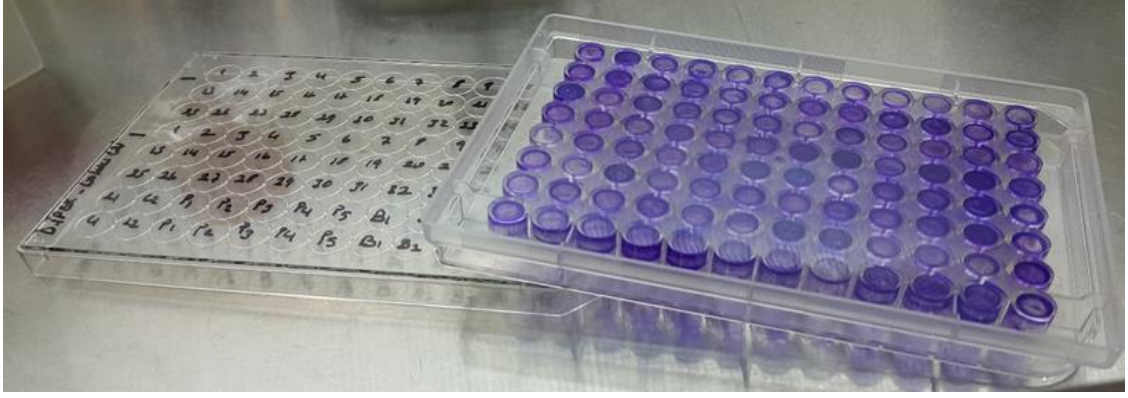




Şekil 3.1. Congo Red Agar'da pozitif (A) ve negatif (B) reaksiyon veren mikroorganizmalar

#### 3.2.3.11.2. Kristal Viyole Mikroplaka Yöntemi ile Belirlenmesi

İzolatlar 5 mL Tryptone Soy Broth'a (Merck 105459, Almanya) ekilerek, izolasyon sıcaklığına göre 30 ve 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucu kültürler hazırlanmıştır. Kültürler 0,5 Macfarland değerine ayarlandıktan sonra herbir kültürden 20 µL alınarak içinde 100 µL TSB bulunan 96-kuyucuklu mikroplaka (SPL Life Sciences, Pocheon-Si, Güney Kore) kuyucuklarına aktarılmıştır. Mikroorganizma türüne bağlı olarak 30 ve 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında kuyucuklar steril saf su ile en az iki kere yıkanmıştır. 120 µL Kristal viyole (0,1%) (PubChem CID: 11057) her bir kuyucuğa konulmuş ve plaka ortam sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar steril saf su ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 120µL %96'lık etanol (PubChem CID:702) aktarılmış ve 1 saat bekletildikten sonra OD 600 nm'de (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) absorbans değerleri okunmuştur (O'Toole, 2011; Biswa ve Doble, 2013; Lade ve ark., 2014).



Şekil 3.2. Kristal viyole mikropilaka yöntemi uygulaması

İzolatların biyofilm oluşturma durum değerlendirmesi OD değerleri temel alınarak yapılmıştır. Yönteme göre içinde sadece kullanılan besiyerinin olduğu kontrol kuyucuğundan elde edilen OD değeri kontrol olarak değerlendirilmiş ve temel olarak alınmıştır. Kuyucuktan elde edilen OD değeri kontrol kuyucuğundan ( $OD_{kontrol}$ ) elde edilen değer ile eşit veya az ise mikroorganizmanın biyofilm oluşturmadığı şeklinde değerlendirme yapılmıştır. OD değerleri  $OD_{kontrol} < OD \leq 2 \times OD_{kontrol}$  zayıf seviyede biyofilm oluşturduğu,  $2 \times OD_{kontrol} < OD \leq 4 \times OD_{kontrol}$  orta seviyede biyofilm oluşturduğu ve  $4 \times OD_{kontrol} < OD$  durumunda ise güçlü seviyede biyofilm oluşturduğu değerlendirilmiştir (Sepanovic ve ark., 2000; Simoes ve ark., 2007; O'Toole, 2011; Saising ve ark., 2012; Darwish ve Asfour, 2013; Lade ve ark., 2014).

### 3.2.3.12. Quorum Sensing Sinyal Varlığının Ortaya Konulması (AHL-AI-2)

İzolatlarımızın bir kısmının Gram negatif bir kısmının da Gram pozitif olması nedeniyle Gram negatif bakterilerce kullanılan AHL sinyal varlığı yanı sıra her iki tür tarafından özellikle Gram pozitif bakterilerce kullanılan AI-2 sinyal varlığı da incelenmiştir.

#### 3.2.3.12.1. AHL Sinyal Varlığının Ortaya Konulması

Gram negatif bakteriler için; Luria-Bentani sıvı besiyerinde (BD-Difco, ABD) gerekli antibiyotikler (kanamycin 20 $\mu$ g/mL, spectinomycin 50  $\mu$ g/mL ve tetracycline 4,5 $\mu$ g/mL) ilave edilerek 30°C'de 24 saat geliştirilen indikatör mikroorganizmalardan (*Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* A136) Luria-Bentani agar'a (22460, BD-Difco, ABD) öze ile nokta ekimler yapılmıştır. 30°C'de 24 saat sonunda petrilerdeki renk değişimlerine göre AHL sinyal varlıkları pigment oluşumu ile ortaya konulmuştur (Lade ve ark., 2014; Sun ve ark., 2015).

### 3.2.3.12.2. AI-2 Sinyal Varlığının Ortaya Konulması

Gram pozitif bakteriler için; AI-2 Bioassay yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde indikatör olarak *Vibrio harveyi* BB 170 kullanılmıştır. Siyah mikropilaka (SPL Life Sciences, Pocheon-Si, Güney Kore) kullanılarak OD 600 nm’de okuma yapılmış (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD; Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ve ışınma değerlerine göre mikroorganizmaların AI-2 aktivite değeri belirlenmiştir.

Bu yöntemde, Marine Broth’da (2216-BD Difco, ABD) 37°C’de geliştirilmiş 24 saatlik *V. harveyi* BB 170, içerikten hazırlanan AB besiyerine (Ek 3) inokule edilerek 1:5000 oranında bir dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyondan her bir kuyucuğa 100 µL eklenmektedir. Sinyal varlığı araştırılacak olan mikroorganizmaların Tryptone Soy Broth’da (Merck 105459, Almanya) 24 saatlik kültürleri hazırlanmıştır. Sinyal molekülleri kültürlerin 14000 rpm/5 dk santrifüjlenmesi ve üstteki süpernatantın alınması ile elde edilir. Her bir sinyal içeren süpernatant’dan 10 µL siyah mikropilakalara eklenerek, 600 nm’de OD’leri mikropilaka okuyucu (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD; Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ile belirlenmiştir (Vilchez et.al., 2007; Turovskiy and Chikindas, 2006; Taga and Xavier, 2011; Park ve ark., 2014; Sun et.al., 2015).

### 3.2.3.13. İstatistiksel Analizler

ATP-Biyoluminesans ve standart metodun karşılaştırıldığı çalışma verilerinin istatistiksel analizleri için IBM SPSS Version 19 for Windows (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, ABD) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Metodlar arasındaki korelasyonun tespiti için korelasyon analizi yapılmış; Spearman korelasyon katsayısına göre ( $P < 0.05$ ) aradaki korelasyonun istatistiki olarak önemli olup olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca kappa değerleri belirlenerek; korelasyonların tesadüfi olma durumları da incelenmiştir (Armstrong & Hilton, 2011; İpek ve Zorba, 2014).

### **3.3. Çalışma 2. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturan İzolatlar Üzerine Etkili Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddelerin Belirlenmesi**

#### **3.3.1. Kullanılan Kültürler**

Bu çalışma kapsamında üç farklı firmanın üretim hattından izole edilen biyofilm pozitif mikroorganizmalar üzerinde çalışılmıştır. *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp. ve *Bacillus* spp. olarak tanımlanan izolatlardan her iki yöntem ile (Congo Red Agar ve kristal viyole mikropilaka yöntemleri) de biyofilm pozitif olan birer izolat seçilmiştir. *Listeria* spp. olarak 1 nolu izolat *Listeria innocua*, *Pseudomonas* spp. olarak 18 nolu izolat *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacteriaceae* olarak 6 nolu izolat *Enterobacter cloacae*, *Bacillus* spp. olarak 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* ve *Streptococcus* spp. olarak salamura teknesinden elde edilen 27 nolu izolat *Streptococcus lactis* çalışılacak kültürler olarak seçilmiştir.

Bu mikroorganizmaların yanı sıra kontrol olarak dezenfektan etkinliğinin araştırılmasında kullanılan standart suşlar; *Eshcherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ve *Micrococcus luteus* ATCC 4698 kullanılmıştır (Huang ve ark.,1992; Bore ve Langsrud, 2005; Manjumeena ve ark., 2014; Vazquez-Sanchez ve ark., 2014; Zou ve ark., 2014; Fekadu ve ark., 2015). Standart suşlar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi laboratuvarı tarafından sağlanmıştır.

#### **3.3.2. Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddeler**

Çalışma boyunca literatürde antimikrobiyal ve/veya quorum quenching etkilerine rastlanılan, ülkemizde kolay elde edilebilir, yüzeylerde renk değişimine neden olmayacak, ucuz doğal maddeler araştırılmıştır. Doğal madde olarak Epigallocatechin gallat (PubChem CID: 65064), *Panax ginseng*, curcumin (PubChem CID: 969516), *Camellia sinensis* (yeşil çay), vanilin (PubChem CID: 1183), kırmızı *Panax ginseng*, *Ganoderma lucidum* (Reishi mantarı), *Prunella vulgaris* (prunella, yara otu), *Sambucus nigra* (kara mürver), *Cichorium intybus* (hindiba), *Calendula officinalis* (aynı sefa), boraks (sodium tetraborat dekahidrat), propolis, resveratrol, elma sirkesi, nisin, *Hypericum perforatum* (sarı kantaron) ve *Thymus vulgaris* (kekik) kullanılmıştır. Epigallocatechin gallat (Sigma-Aldrich, Almanya), vanilin (Sigma-Aldrich, Almanya) ve curcumin (Sigma-Aldrich, Almanya) Konkuk Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Laboratuvarları, Seul, Güney Kore'den temin edilmiştir. *Ganoderma lucidum*, *Panax ginseng*, kırmızı *Panax ginseng* ve *Camellia sinensis* Seul, Güney Kore

Emart marketlerinden temin edilmiştir. *Prunella vulgaris*, *Sambucus nigra* Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. *Cichorium intybus*, *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum* ve *Thymus vulgaris* Çanakkale Kaz Dağları'ndan toplanmıştır. Elde edilen bitkilerin latince isimleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Bilimi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Ersin KARABACAK tarafından doğrulanmıştır. Boraks (EGAŞ, Türkiye, PubChem CID:10219853), propolis (Arıdünyası, Türkiye), elma sirkesi (Kühne, Almanya), nisin (Biokim Kimya, Türkiye, PubChem CID:16219761) ve resveratrol (Sigma-Aldrich, Almanya, PubChem CID:445154) Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı'ndan temin edilerek çalışmamızda kullanılmıştır.



Şekil 3.3. *Cichorium intybus*, *Calendula officinalis*, propolis, resveratrol, *Hypericum perforatum*, *Thymus vulgaris*, boraks, nisin fotoğrafları

### 3.3.3. Yöntem

#### 3.3.3.1. Doğal Maddelerden Ekstrakt Eldesi

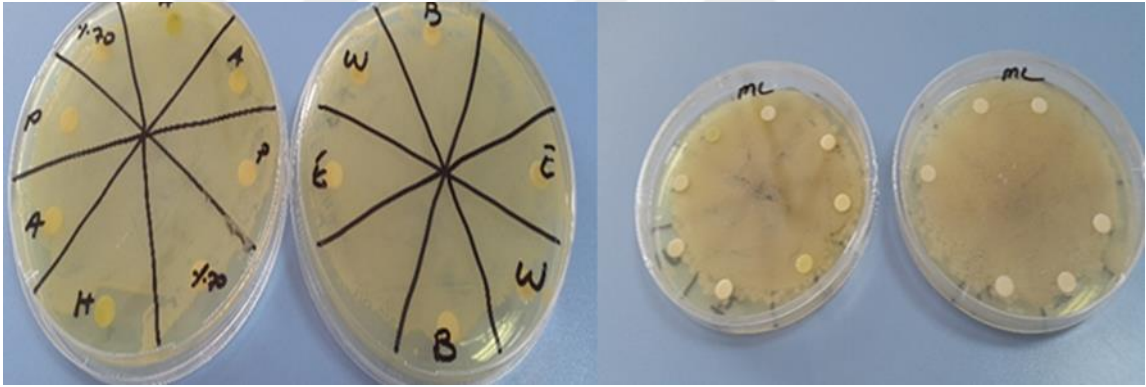
Bu maddelerin ekstraktları insan sağlığına olumsuz etkisi olmayan, kullanılan bitkilerin fenolik maddelerinin ortaya çıkması konusunda yardımcı ve gıda üretim hattında dezenfektan bir madde olarak kullanılan %70'lik etil alkol kullanılarak elde edilmiştir (Deng ve ark., 2014; Shah ve ark., 2014; Singh ve ark., 2016; Alsaggaf ve ark., 2017).

İlgili maddelerin 1 mg/mL'lik ekstraktları hazırlanarak denemelere tabi tutulmuştur. Çalışma sırasında Boraks'ın 2 mg/mL lik ekstraktı da hazırlanarak daha etkili konsantrasyon aranmıştır. Bitki halinde olan doğal maddeler 1 mg/ml olacak şekilde etil alkolde

hazırlanmış; 6 saat boyunca 180 rpm'de çalkalanarak bekletilmiştir. Elde edilen tüm ekstraktlar 0,2 µm'lik steril filtre ile steril edilmiştir (Lade et.al., 2015, Özcan ve Zorba, 2014).

### 3.3.3.2. Antimikrobiyal Etki Analizi (Antibiyofilm)

Tryptone Soy Broth'da (Merck 105459, Almanya) bakteri özelliklerine göre 30 °C ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmalar, 10<sup>8</sup> kob/mL seviyesinde (MacFarland 0,5) uygun sıcaklıktaki Mueller Hilton Agar'a (Merck 105435, Almanya) inoküle edilip petrilere dökülmüştür. Steril boş diskler petrilere yerleştirilerek ilgili doğal madde ekstraktlarından 15µL bu disklere eklenmiş ve petrilere; izolatların gelişme sıcaklığına göre 30 ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zon çapları ölçülerek etki değeri hesaplanmıştır. Kontrol olarak %70 etil alkol ve su kullanılmıştır (EUCAST, 2014; Zorba ve Özdikmenli, 2015; Nam et.al., 2015).



Şekil 3.4. Disk difüzyon (Kirby-Bauer) metodu ile antimikrobiyal-antibiyofilm analizi

### 3.3.3.3. Antiquorum Sensing Etki Analizi (AHL, AI-2)

#### 3.3.3.3.1. AHL Sinyallerinin İnhibisyonu

AHL inhibisyonu için indikatör olarak *Chromobacterium violaceum* ve *Agrobacterium tumefaciens* kullanılmıştır. 0,5 Macfarland'a ayarlanan 24 saat'lik indikatör mikroorganizmalardan 1,25 ml alınarak yayma plak yöntemi ile içinde Luria Bentani Agar-LB-Agar (22460, BD-Difco) (0,3% w/v) bulunan petrilere inoküle edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* için 80 µg/mL olacak şekilde X-gal (PubChem CID: 65181) besiyeri üzerine inokulumdan önce yayılmıştır. 30°C'de 24 saat geliştirilen indikatör mikroorganizmalar üzerine doğal maddelerin quorum quenching etkisi disk-difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem de her bir diske 15µL etkisi araştırılan madde

eklenmiştir. Negatif kontrol olarak su ve %70'lik etil alkol kullanılmıştır. QS inhibisyon miktarı opak/temiz zonların ölçülmesi ile bulunmuştur (Chenia, 2013; Lade ve ark., 2015; Truchado ve ark., 2015; Rahman ve ark., 2016).

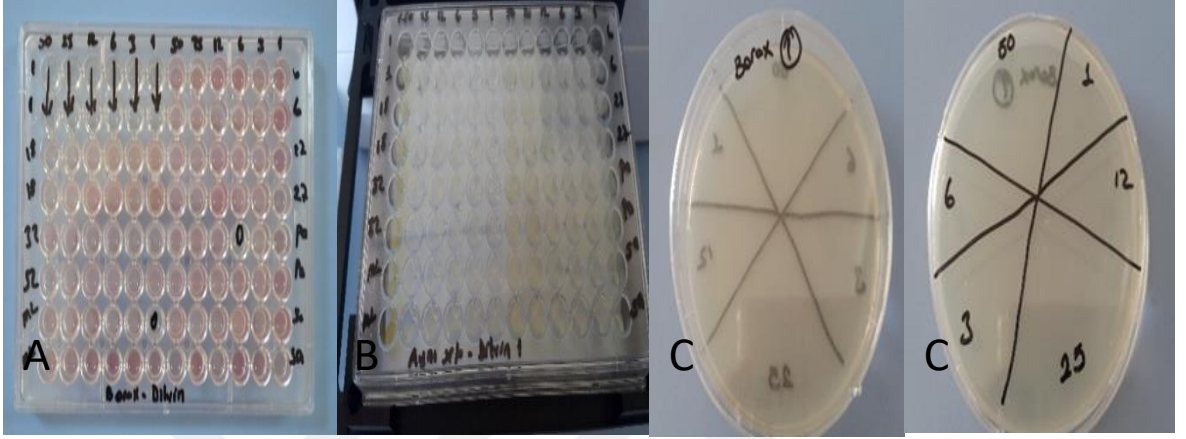
### **3.3.3.3.2. AI-2 Sinyallerinin İnhibisyonu**

AI-2 sinyallerinin inhibisyonu analizi için, *Vibrio harveyi* BB 170 indikatör olarak kullanılmıştır. Marine Broth (2216-BD Difco, ABD) besiyerinde 24 saat geliştirilen indikatör mikroorganizma ile içerikten hazırlanan AB besiyeri kullanılarak 1:5000'lik bir dilüsyon hazırlanmıştır. Siyah mikropilaka (SPL Life Sciences, Pocheon-Si, Güney Kore) kuyucuklarının her birine 100 µL 1:5000'lik dilüsyondan konulmuştur. AI-2 aktivitesi olduğu tespit edilmiş bir mikroorganizma (0,5 ml), 3 ml LB broth (22460, BD-Difco, ABD) ve 2 mL doğal ekstrakt konulmuş besiyerine inoküle edilmiş; 30°C'de 4-6 saat inkübe edilmiştir. 4-6 saat inkübasyon sonrası geliştirilen mikroorganizmanın AI-2 sinyalleri 14.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra süpernatantları alınarak elde edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan her bir kuyucuğa 50µL eklenmiştir. 490nm'de OD'leri mikropilaka okuyucu (iMark™ Microplate Absorbance Reader 168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD; Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ile belirlenmiş; inhibisyon miktarları hesaplanmıştır (Almasoud ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2015).

### **3.3.3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK), Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%inhibisyon) Değerlerinin Belirlenmesi**

Doğal maddelerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), 96-kuyucuklu mikropilakalar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Tryptone Soy Broth'da (Merck 105459, Almanya) izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmalar, 10<sup>8</sup> kob/ml seviyesine (MacFarland 0,5) ayarlanmıştır. Her bir mikropilaka kuyucuğuna 50 µl Mueller Hilton Broth (Merck 105435, Almanya) ve 50 µl doğal ekstraktlar konularak %50, %25, %12,5, %6,25, %3,125, %1,5625 oranlarında dilüsyonları hazırlanmıştır. Yine her bir kuyucuğa 50 µL 10<sup>8</sup> kob/ML seviyesinde mikroorganizmalar eklenerek, izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüm farklı yüzdelikteki maddeler varlığında mikroorganizmaların bulunduğu kuyucuklardan örnekler Mueller Hilton agar'a (Merck, 105437, Almanya) ekilmiş; izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 ve 37°C'de 24 saat gelişim durumuna göre minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlenmiştir. Hemen MBK analizi sonrası mikropilakalar 600nm'de OD değerleri mikropilaka okuyucu (Multiscan

FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ile belirlenmiş; MİK değerleri her bir kuyucuğa 30µl %0,01'lik tetrazolium (2,3,5-Trifenil-tetrazolyum klorid) (PubChem CID:9283) çözeltisi konularak renk değişimlerine göre kontrol edilmiştir. % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (1/2 MİK/MBK değeri üzerinden) (Quave ve ark., 2008; Cheina, 2013; EUCAS, 2014; Eriş, 2011; Lade ve ark., 2015).



Şekil 3.5. MİK analiz (A), % İnhibisyon analizi (B), MBK analizi (C)



### **3.4. Çalışma 3. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturabilen İzolatların Üzerine Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Geliştirilmesi**

#### **3.4.1. Materyal**

##### **3.4.1.1. Kullanılan Kültürler**

Bu çalışma kapsamında doğal madde kombinasyon denemelerinde yine biyofilm üretebilen ve quorum sensing aktivitesi bulunan izolatlarımızdan 1 nolu izolat *Listeria innocua*, 18 nolu izolat *Pseudomonas stutzeri*, 6 nolu izolat *Enterobacter cloacea*, 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* ve 27 nolu izolat *Streptococcus lactis* örnek olarak seçilmiştir. Bu mikroorganizmaların yanı sıra kontrol olarak dezenfektan etkinliği araştırmaları için standart suşlar; *Esherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ve *Micrococcus luteus* ATCC 4698 kullanılmıştır (Bore ve Langsrud, 2005; Manjumeena ve ark., 2014; Vazquez-Sanchez ve ark., 2014; Zou ve ark., 2014; Fekadu ve ark., 2015; Hwang ve ark., 2015).

Formülasyon geliştirilmesi çalışmasında, antibiyofilm ve quorum quenching etkinliği en yüksek olan iki materyalin kombinasyonu Ezine peyniri üretim hattında oldukça yayılmış olduğu görülen, sporlu ve dolayısı ile temizlenmesi zor olan *Bacillus* spp.'ye ait izolatımız olan 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* kullanılmıştır.

##### **3.4.1.2. Kombinasyon Denemesi için Kullanılan Doğal Maddeler**

Antimikrobiyal ve quorum quenching analizleri sonuçlarına göre etkili olduğu belirlenen maddeler ikili, üçlü ve dörtlü olmak üzere kombine edilerek antimikrobiyal etkinin değişimi araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda Epigallic acid, propolis, *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Hypericum perforatum*, nisin ve boraks seçilmiştir.

##### **3.4.1.3. Yeni Dezenfektan Formülleri Geliştirilmesi**

Bu çalışmada gıda endüstrisinde üretim hatlarında kolay dolaşabilecek, püskürtülebilecek, ucuz, üretim hatlarına kolay adapte edilebilen, doğal antimikrobiyal ve anti-quorum sensing maddeler ile kombine edilebilecek insan sağlığı üzerine olumsuz etkisi olmayacak su yerine formülasyonlar denenmiştir. Bu arada %1'lik NaCl (PubChem CID: 5234), %0,16'lık EDTA (PubChem CID: 6049) ve %0,32'lik EDTA kullanılmıştır. Bu maddelerin doğal ekstraktlar ile %0, %25, %50, %75 ve %100'lük karışım oranları denenmiş ve bu kombinasyonların yüzde inhibisyon oranları belirlenmiştir (Huang ve ark. 1992; Facon ve Skura, 1995; Güçbilmez ve ark., 2007; Sivarooban ve ark., 2007; Wijnker ve ark., 2006; Bidlas ve Lambert, 2007).

### 3.4.2. Yöntem

#### 3.4.2.1. Antimikrobiyal Etki Analizi

Tryptone Soy Broth'da (Merck 105459, Almanya) izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmalar, 10<sup>8</sup> kob/mL seviyesine (MacFarland 0,5) ayarlandıktan sonra uygun sıcaklıktaki Mueller Hilton Agar'a (Merck 105435, Almanya) inoküle edilip petrilere dökülmüştür. Steril diskler petrilere yerleştirilerek ilgili doğal madde ekstraktlarından 15µL bu disklere konulmuş; izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 ve 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zon çapları ölçülerek etki değeri hesaplanmıştır (EUCAST, 2014; Zorba ve Özdikmenli, 2015; Nam et. al., 2015).

#### 3.4.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK), Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%inhibisyon) Değerlerinin Belirlenmesi

Kombinasyonların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), 96-kuyucuklu mikropalakalar ile mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Tryptone Soy Broth'da (Merck 105459, Almanya) izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 °C ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen mikroorganizmalar, 10<sup>8</sup> kob/mL seviyesine (MacFarland 0,5) ayarlanmıştır. Her bir mikropalaka kuyucuğuna 50 µL Müller Hilton Broth (Merck 105435, Almanya) ve 50 µL doğal ekstraktlar konularak %50, %25, %12,5, %6,25, %3,125, %1,5625 oranlarında dilüsyonları hazırlanmıştır. Yine her bir kuyucuğa 50 µL 10<sup>8</sup> kob/ml seviyesinde mikroorganizmalar eklenerek, izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 °C ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüm farklı yüzdelerdeki maddeler varlığında mikroorganizmaların bulunduğu kuyucuklardan örnekler Mueller Hilton agar'a (Merck, 105437, Almanya) ekilmiş; izolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 °C ve 37°C'de 24 saat gelişim durumuna göre minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlenmiştir. Hemen MBK analizi sonrası mikropalakalar 600 nm'de OD değerleri mikropalaka okuyucu (Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ile belirlenmiş ve %inhibisyon değerleri hesaplanmış (1/2 MİK/MBK değeri üzerinden); MİK değerleri her bir kuyucuğa %0,01'lik tetrazolyum klorür (2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorid) (PubChem CID:9283) çözeltisi konularak belirlenmiştir. Renk değişimlerine göre üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir (Quave ve ark., 2008; Cheina, 2013; EUCAS, 2014; Eriş, 2011; Lade ve ark., 2015).

Yeni formüllerin yüzde inhisyon analizlerinde ise; seçilen doğal madde ve doğal madde kombinasyonlarının % 1 NaCl, %0,16 EDTA ve %0,32 EDTA kullanılarak

hazırlanan %0, %25, %50, %75 ve %100'lük karışım oranları hazırlanmıştır. Her bir mikrolaka kuyucuğuna 50 µL Müller Hilton Broth (Merck 105435, Almanya) ve 50 µL doğal farklı yüzdelikli yeni formüller konulmuştur. Yine her bir kuyucuğa 50 µL  $10^8$  kob/mL seviyesinde 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* eklenerek 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 600 nm'de mikrolaka okuyucu (Multiscan FC; Thermo Fisher Scientific, NY, ABD) ile %inhibisyon miktarı belirlenmiştir. (Quave ve ark., 2008; Cheina, 2013; Eriş, 2011; Lade ve ark., 2015).



### **3.5. Çalışma 4. Antibiyofilm-Antiquorum Sensing Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Dezenfektan Etkinliği ve Korozyon Oluşturma Durum Tespiti**

#### **3.5.1. Materyal**

##### **3.5.1.1. Kullanılan Kültürler**

Çelik plaka dezenfektan etkinliği denemelerinde, mikroorganizma olarak üç firmanın yüzeylerinden izole edilen, biyofilm oluşturma kapasitesi oldukça yüksek olan *Enterobacteriaceae* familyasına ait 6 nolu izolat *Enterobacter cloacea* ile üretim hattında oldukça yaygın olduğu gözlemlenen sporlu bakteri izolatımız 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* kullanılmıştır.

Çelik plaka yüzeylerinde korozyon oluşumu durum tespiti denemelerinde ise 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* kullanılmıştır.

##### **3.5.1.2. Kullanılan Çelik Plaka Kuponlar**

Çalışma kapsamında, Ezine peyniri üreticileri tarafından da tercih edilen paslanmaz çelik 316 L kullanılmıştır. Kuponlar 1,8x1,8 cm boyutlarında lazer kullanılarak kesilmiş ve Kromel A.Ş. (Arifiye/ Sakarya, Türkiye) tarafından hazırlanmıştır.

#### **3.5.2. Yöntem**

##### **3.5.2.1. Çelik Plaka Yüzeyler Üzerine Kullanılacak Temizlik ve Dezenfeksiyon Yönteminin Belirlenmesi**

Temizlik prosedürü olarak (CIP), çalışmamızda temizlik öncesi ve sonrası üretim hatlarının mikrobiyal yükü belirlenmiş olan firma B'nin prosedürü izlenmiştir. Bu prosedür 70-80°C kostik 45 dk., ortam sıcaklığında su 15 dk., 70-80°C asit (nitrik asit-PubChem CID:944) 45 dk. ve son olarak 80-90°C sıcak su 15 dk. şeklinde uygulanmaktadır. Her üç firma da CIP ile temizlenen yüzeylerde kimyasal dezenfektan kullanmamaktadır. Firma B COP ile temizlenen yüzeylerde perasetik asit kullanmaktadır. Bu nedenle denememizde tarafımızdan geliştirilen kombinasyonlar yanı sıra sadece CIP uygulaması yapılmış çelik plakalar ve CIP sonrası ticari dezenfektan madde olan perasetik asit uygulanmış yüzeyler de kullanılmıştır.

##### **3.5.2.2. Çelik Plaka Yüzeylerinin Pasifizasyonu**

Yapılan çalışmada çalışılan üç firma tarından seçilen paslanmaz çelik 316 L kullanılmıştır. 1.8x1,8 cm'lik kuponlar halinde kesilen yüzeyler firmalarda yapıldığı üzere

1N'lik Hidrojen Klorür (HCl) (PubChem CID: 313) içerisinde 24 saat bekletilerek pasifize edilmiştir.

Çelik plaka yüzeyler saf su ile yıkandıktan sonra kaba süzgeç kâğıdı ile yüzeyler temizlenmiştir, desikatör veya laminar akış kabini içerisinde kurutulup analizlerde kullanılmıştır.

### **3.5.2.3. Çelik Plaka Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturulması**

Çalışmada iki paralel, üç tekerrür olacak şekilde planlanmıştır. Mikroorganizmalar (*Enterobacter cloacea*-6 ve *Bacillus coagulans*-32) 30°C'de 24 saat Tryptone Soya Broth-TSB (Merck 105459, Almanya) besiyerinde geliştirilmiştir. Macfarland 0,5 (10<sup>8</sup>kob/mL) seviyesinde kültürlerden 450 µL alınarak içerisinde 1 adet steril çelik plaka ve 45 ml UHT süt bulunan 50 mL'lik falkon tüplerine inoküle edilmiştir. İzolatların gelişme sıcaklıklarına göre 30 °C ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Böylece başlangıç hücre konsantrasyonu 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> kob/mL dolaylarında olacak şekilde biyofilm oluşumu sağlanmıştır (Doufour ve ark., 2004; Dosti ve ark., 2005; Ölmez, 2009; Valerino ve ark., 2012; Vazquez-Sanchez ve ark., 2013).

### **3.5.2.4. Çelik Plaka Dezenfektan Etkinliği Analizi**

İnkübasyon sonrası pasifize çelik plakalardan 16 adet alınmıştır. Bu plakalardan 2'sine hiçbir işlem uygulanmazken, kalan plakaların 2'sine sadece firma B'nin CIP prosedürü uygulanmıştır. CIP uygulanmış çelik plaka örneklerinin kalan 12'sine ise ticari dezenfektan madde (perasetik asit-PubChem CID: 6585) ve çalışma sırasında belirlenen iki yeni dezenfektan (Boraks+%0,16 EDTA, 1:1 EGCG: Boraks+%0,32), 5 ve 15 dk. olmak üzere iki farklı sürede uygulanmıştır. Her uygulamada her bir örnek için 2 farklı çelik plaka kullanılmıştır. Sonraki aşamada her bir plaka yüzeyinde kalan sesil ve biyofilm oluşturabilen mikroorganizma yükünün doğru tespiti için plakalar içerikten hazırlanan 20 ml D/E Nötralizasyon broth (Ek 2) içerisine atılarak 10 dk ortam sıcaklığında tutulmuş; dezenfektan etkileri nötrlenmiştir. Sesil ve biyofilm oluşturabilen mikroorganizma yükü zararlanmış hücrelerin geri kazanımı için kullanılan %0,2 oranında yeast ekstrakt (Merck 103750, Almanya) içeren Brain Heart Infusion Agar (Merck 110493, Almanya) besiyerinde *E.cloacea* için 37°C'de 24 saat, *B.coagulans* için 30 °C'de 24 saat inkübe edilerek tespit edilmiştir (Doufour ve ark., 2004; Dosti ve ark., 2005; Ölmez, 2009; Valerino ve ark., 2012; Vazquez-Sanchez ve ark., 2013).

### **3.5.2.4.1.Çelik Plaka Yüzeylerinde Sesil ve Biyofilm Oluşturabilen Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi**

Nötralizasyon sonrasında çelik plakalar %0,1'lik peptonlu su ile 2 kez yıkanmıştır. %0,1 peptonlu su (Merck 107228, Almanya) içerisindeki mikroorganizmalar sesil mikroorganizma sayısının belirlenmesi için örnek olarak kullanılırken; 10 mL %0,1 peptonlu su içerisindeki swap ile üç defa çelik plaka yüzeylerinden alınan hücreler biyofilm oluşturabilen mikroorganizma sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır. Sayım için yayma plak yöntemi kullanılmış olup; besiyeri olarak zarar görmüş mikroorganizmaların da geri kazanılması amacı ile %0,2 yeast ekstrakt (Merck 111926, Almanya) eklenerek hazırlanmış Brain Hearth Infusion Agar (Merck 110493, Almanya) (BHA+%0,2 yeast agar) kullanılmıştır. Sayımlar mikroorganizma türüne göre 30°C ve 37°C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilmiştir (Doufour ve ark., 2004; Dosti ve ark., 2005; Ölmez, 2009; Valerino ve ark., 2012; Vazquez-Sanchez ve ark., 2013).

### **3.5.2.5. Temizlik ve Dezenfeksiyon Sürecinde Kullanılan Maddelerin Çelik Plaka Yüzeylerinde Korozyon Etkisinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada pasifize edilmiş çelik 316 L örnekleri üzerine CIP, perasetik asit (ticari dezenfektan), yeni ve doğal dezenfektan maddelerimizin (Boraks+%0,16 EDTA, 1:1 EGCG: Boraks+%0,32 EDTA) korozyon etkileri belirlenmiştir.

#### **3.5.2.5.1. SEM-EDX Analizi ile Korozyon Tespiti için Örneklerinin Hazırlanması**

Sadece pasifize edilmiş temiz çelik plaka, CIP uygulanmış, CIP sonrası ticari dezenfektan perasetik asit 15 dk. uygulanmış, yeni 15 dk dezenfektan maddeler uygulanmış çelik plakalar öncelikle laminar akış kabinde veya desikatör yardımı ile kurutulmuştur. Daha sonra etil alkol ile dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hazırlanan %15, 30, 50,70 ve 95'lik etil alkol (PubChem [CID:702](#)) çözeltilerinde 15'er dakika bekletilen örnekler, %100 veya %99,5'lük etil alkolde 3 defa 10'ar dakika bekletilmiş ve daha sonra oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır.

Suyu iyice uzaklaştırılan çelik yüzeyler 15 kv voltaj altında altın (Au) ve paladyum (Pd) ile Denton Vacuum Desk V cihazı kullanılarak kaplanmıştır (Erdim, 1987; Congmin ve ark., 2006; Tabrizi, 2012; Ünsal ve ark., 2016; Robertson ve ark., 2016).

### **3.5.2.5.2. SEM-EDX Analizi ile Korozyon Tespiti**

JEOL SEM-7100-EDX cihazı kullanılarak 15 kv'de elik plaka yüzeylerinde 1-10 μm'e kadar inilerek elik plaka yüzeylerindeki kırık açıklıkları llmŖ, korozyon türleri belirlenmeye alıŖılmıŖ, ardından AZTec Dedektör Oxford Instrument Xmax 2015 programı kullanılarak SEM görüntüleri üzerinden EDX ile elemental analiz yapılmıŖtır. SEM-EDX analizi temizlik ve dezenfeksiyonda kullanılan maddelerin yüzeylerde kalıntı bırakma durumları, korozyon sonucu ortamda açığa çıkan demir miktarı incelenmiŖtir (Tabrizi, 2012; Aruliah ve Ting, 2014; Kleampfl ve ark., 2014; Bozorg ve ark., 2016; Eduoket ve ark., 2016; Nan ve ark., 2016; Rajala ve ark., 2016; Robertson ve ark., 2016; nsal ve ark., 2016).



## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### **4.1. Peynir Üretim Hatlarının Mikrobiyolojik Yükünün Belirlenmesi, İzolatların Alınması, Tanımlanması, Biyofilm Kapasitesinin ve Quorum Sensing Sinyal Varlığının Belirlenmesi**

Çalışmanın bu bölümünde Ezine peyniri üreticisi üç firma üretim hatlarından izolatlar alınmış, API kitleri kullanılarak fenotipik olarak tanımlanmış, Congo Red Agar ve kristal viyole mikroparka yöntemleri ile biyofilm oluşturma kapasitesi belirlenmiş ve son olarak izolatların Quorum Sensing sinyal varlığı belirlenmiştir.

##### **4.1.1. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatları/Alanlarının ve Temizlik Dezenfeksiyon Programlarının Değerlendirilmesi**

Ezine peynir üretim alanları genellikle çiğ süt kabul platformu, pastörizasyon bölümü, Bulgar teknelerinin bulunduğu üretim, dolum, dinlendirme ve kapatma, kalıplama ve paketleme, soğuk hava deposu bölümlerinden oluşmaktadır. Üretim alanları genel itibari ile su ve atık su alt yapısı bulunmayan, şehir dışında ekim alanlarına ve yola yakın alanlarda inşaa edilmiştir.

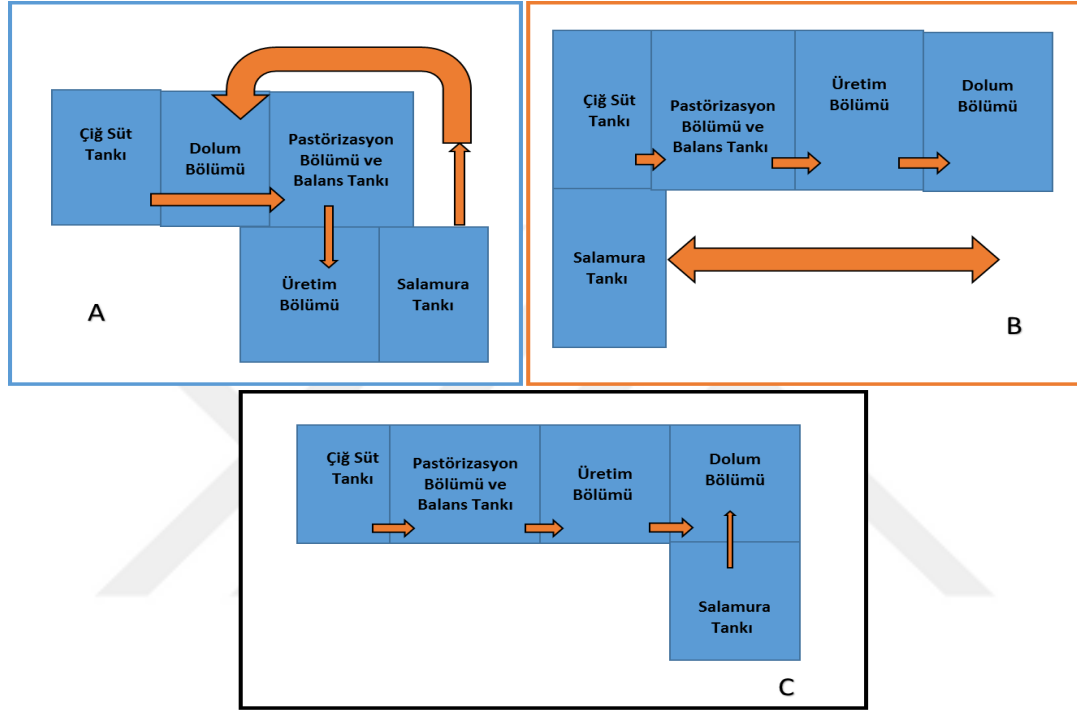
Firma A, Çanakkale’de bulunan Ezine-Bayramiç yolunda bulunan bir köy içerisinde konumlandırılmıştır. Firma etrafında konvansiyonel tarım yapılan bir arazi içine inşa edilmiştir. Yaklaşık 50 yıldır üretim yapan firma, oldukça eski ve tadilatlarla büyütülmüş bir üretim hattına sahiptir. Üretim alanında havalandırma fanları ve hava perdeleri bulunmasına karşın, üretim alanlarının eklenerek yapılması nedeniyle açık havaya açılan kapılar sıklıkla açılıp kapanmaktadır. Ayrıca üretimde bulunan dinlendirme aşamasında, tenekelere dolumu yapılan peynirler ortalama 24 saat ağzı açık tenekelerde dinlendirme odalarında bekletilmektedir. İşletme içerisinde kullanılan su alt yapı eksikliği nedeniyle kuyu suyunun ozonlanması yolu ile temizlenmektedir. Üretim bıçakları ayrıca UV ile sterilize edilmektedir.

Firma B, Ezine ilçesi merkezinde bir dere kenarında konumlandırılmıştır. 26 yıllık firmada üretim alanı çeşitli inşaatlar ile büyütülmüştür. Firma çalışma başlangıcında kuyu suyunu klorlayarak kullanıyorken; çalışma içerisinde görülen lüzüm ve tavsiyemiz ile şehir şebeke suyunu kullanmaya başlamıştır. Kullanılan tüm su boru hatları değiştirilmiştir. Diğer firmalardan farklı olarak salamura tankları süt alım platformuna yerleştirilmiş olup; CIP



sistemine dahil edilmemiştir. Firma B'nin üretim alanı, A'ya oranla daha sonra inşaa edildiğinden dışarı açılan kapı oranı daha azdır.

Firma C ise en yeni ve planlı üretim hattına sahiptir. 11 yıldır üretim yapan firma temiz-kirli akışı konusunda doğru bir şekilde konumlanmıştır. Bıçaklar için ayrıca UV dolapları bulunurken; işletme içinde klorla temizlenen kuyu su kullanmaktadır. Firmaların yerleşimi ve üretim hattı akış yönü şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Firmaların yerleşimi ve üretim hattı akış yönü (İpek ve Zorba, 2017)

En az 70 personeli bulunan, yaklaşık 60-100 ton/gün üretim kapasitesi olan firmalarda CIP ve COP temizlik protokolleri uygulanmaktadır. Üç firmaya ait temizlik protokolü Çizelge 4.1'de verilmektedir. Bütün işletmelerde duvarlar haftada bir temizlenirken; diğer yüzeyler her gün temizlenmektedir. A ve C firmalarında, üretim bıçakları ayrıca 1 saat süre ile UV kabinlerine konarak sterilize edilmektedir. Personel hijyeni için pedallı el lavaboları, alkol bazlı deterjan ve üretim sırasında gerektiğinde el hijyeni için %70'lik etil alkol kullanılmaktadır. Her üç firmada da personel üretim alanına içinde klorlu su bulunan havuzdan geçerek gidebilmektedir; fakat bu havuzdaki sular sıklıkla temizlenmemektedir.

Çizelge 4.1. İşletmelerde kullanılan temizlik prosedürleri

| <b>Firma</b> | <b>Üretim Noktası</b>                                 | <b>Temizlik Türü</b> | <b>Protokolü</b>  |
|--------------|---|----------------------|---|
| <b>A</b>     | Çiğ Süt Tankı   | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk.60-65°C baz muamele + 5 dk. su ile durulama +15dk. 60-65°C asit muamele+ 5 dk.70-80°C su ile muamele (Her gün)  |
|              | Pastörizasyon Ünitesi                                 | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk. 60-65°C baz muamele + 5 dk. su ile durulama +15dk. 60-65°C asit muamele+ 5 dk.70-80°C su ile muamele (Her gün) |
|              | Ekipmanlar (Bulgar teknesi, bıçaklar, maya maşrapası) | <b>COP</b>           | 150 ppm klor bazlı dezenfektanlı suda 10 dk muamele; ayrıca bıçaklar 1 saat UV kabinine konur (Her gün)                                     |
|              | Cendere Bezi  | <b>COP</b>           | 150 ppm klor bazlı dezenfektanlı suda 1 saat muamele (Her gün)  |
|              | Salamura Tankı  | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk. 60-65°C baz muamele + 5 dk. Su ile durulama +15dk. 60-65°C asit muamele+ 5 dk.70-80°C su ile muamele (Her gün) |
|              | Duvar   | <b>COP</b>           | Klor bazlı dezenfektanlı deterjan ile 10 dk muamele (Her hafta)   |
|              | Drenaj  | <b>COP</b>           | Klor bazlı dezenfektanlı deterjan ile 10 dk muamele (Her gün)   |
| <b>B</b>     | Çiğ Süt Tankı   | <b>CIP</b>           | 45 dk. 70-80°C baz muamele + 10-15 dk. su ile durulama + 45dk. 70-80°C asit muamele+ 10 dk. 90°C su ile muamele (Her gün)                   |
|              | Pastörizasyon Ünitesi                                 | <b>CIP</b>           | 45 dk. 70-80°C baz muamele + 10-15 dk. su ile durulama + 45dk. 70-80°C asit muamele+ 10 dk. 90°C su ile muamele (Her gün)                   |
|              | Ekipmanlar (Bulgar teknesi, bıçaklar, maya maşrapası) | <b>COP</b>           | Perasetik asit bazlı dezenfektanlı suda 10 dk. muamele (Her gün)  |
|              | Cendere Bezi  | <b>COP</b>           | Gıdaya uygun perasetik asit bazlı deterjan ile muamele (Her gün)  |
|              | Salamura Tankı  | <b>COP</b>           | Perasetik asit bazlı dezenfektan ile 10dk. muamele + su ile durulama 10 dk. (Her gün)   |
|              | Duvar   | <b>COP</b>           | Perasetik asit bazlı dezenfektan ile 10dk. muamele (Her hafta)  |
|              | Drenaj  | <b>COP</b>           | Perasetik asit bazlı dezenfektan ile 10dk. muamele (Her gün)  |
| <b>C</b>     | Çiğ Süt Tankı   | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk. 65-70°C baz muamele + 5 dk. su ile durulama +15dk. 65-70°C asit muamele+ 5 dk.80-90°C su ile muamele (Her gün) |
|              | Pastörizasyon Ünitesi                                 | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk. 65-70°C baz muamele + 5 dk. su ile durulama +15dk. 65-70°C asit muamele+ 5 dk.80-90°C su ile muamele (Her gün) |
|              | Ekipmanlar (Bulgar teknesi, bıçaklar, maya maşrapası) | <b>COP</b>           | 150 ppm klor bazlı dezenfektanlı suda 10 dk muamele; ayrıca bıçaklar 1 saat UV kabinine konur (Her gün)                                     |
|              | Cendere Bezi  | <b>COP</b>           | Gıdaya uygun klor-bazlı deterjan ile muamele (Her gün)  |
|              | Salamura Tankı  | <b>CIP</b>           | 5 dk. su ile duruma + 15 dk. 65-70°C baz muamele + 5 dk. su ile durulama +15dk. 65-70°C asit muamele+ 5 dk.80-90°C su ile muamele (Her gün) |
|              | Duvar   | <b>COP</b>           | Klor bazlı dezenfektanlı deterjan ile 10 dk muamele (Her hafta)   |
|              | Drenaj  | <b>COP</b>           | Klor bazlı dezenfektanlı deterjan ile 10 dk muamele (Her gün)   |

Firmaların CIP prosedürleri ve kullanılan sıcaklıklar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Firma A, yüzeyleri 5 dk.'lık ortam sıcaklığında su ile muamele sonrası 60-65°C kostik ile muamele, 5 dk. ortam sıcaklığında su ile durulama, 60-65°C nitrik asit ile muamele ve son olarak 70-80°C sıcak su ile 5 dk. durulama ile CIP temizliğini gerçekleştirmektedir. B firması, 45 dk 70-80°C kostik muamelesi ardından 10-15 dk. ortam sıcaklığında su ile muamele, 45 dk. 70-80°C nitrik asit ile muamele ve son olarak 90°C sıcak su ile durulama CIP temizliğinin içeriğidir. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere firmalardan A ve C'de CIP; çiğ süt tankı, pastörizasyon ünitesi ve salamura tanklarında uygulanırken; B firmasında sadece çiğ süt tankı ve pastörizasyon ünitesinde kullanılmaktadır. Diğer yüzeyler ise COP prosedürleri ile temizlenmektedir. Her üç firma da CIP prosedürlerinde dezenfektan kullanmamaktadır. COP'de kullanılan ticari dezenfektan ise A ve C 'de klor iken; B firmasında perasetik asittir.

Üretim alanlarının ve üretim yüzeylerinin temizlik sıcaklıkları mikroorganizmalar için son derece önemlidir. Langsrud ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada 50°C'nin altında kostik ve asit uygulamalarının temizliğin etkinliğini azalttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu sıcaklığın *Listeria* spp. açısından kritik olduğunun bildirilmesi büyük bir önem taşımaktadır (Salo ve ark., 2006).

Dezenfektan etkinliği yapılan çalışmalarda, klor bazlı dezenfektanların sporlu bakteriler üzerine etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir (Şenel ve Başoğlu, 2002). Schwach ve Zotta tarafından 1984 yılında yapılan bir çalışmada 150 ppm klorun *Salmonella* spp. biyofilmleri üzerine etkili olmadığı belirtilmiştir (Ölmez, 2009). Perasetik asit uygulamalarının biyofilmler üzerine etkinliğinin tartışmalı olduğu da belirtilmektedir (Vural ve Çelen, 2002). Bu durum her üç firma yüzeylerinde *Bacillus* spp. yaygın olmasının nedeni olabilir.

#### **4.1.2. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatlarındaki Yüzeylerden Alınan Örneklerin Mikrobiyal Yükleri**

Firma üretim hattı yüzeylerinden alınan örneklerin mikrobiyal yükleri ile ilgili çalışma Nisan 2015 ile Kasım 2015 arasında sürdürülmüştür. Çalışmamızın yüzey örneklerinin mikrobiyal yükü ile ilgili üç firmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir. Firmalardan 3'er defa 2 paralel olarak örnekler alınmış, en geç 4 saat içerisinde +4 °C'de analize alınmıştır.

Alınan örneklerin aerobik mezofilik bakteri yükü yanı sıra Ezine peynirinde koku problemine neden olabileceği düşünülen *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. yükleri de incelenmiştir. Süt endüstrisi için önemli bir patojen olan *Listeria* spp. varlığı da incelenmiştir. Analiz süreci boyunca karşılaşılan durumlar firma teknik personeli ile paylaşılmış, alınabilecek önlemler konusunda ortak çalışılmıştır. *Listeria* spp. yükleri yoğun olmadığından bu sonuçlar çizelgelere konulmamış; fakat ayrı bir başlık altında incelenmiştir.

Çizelge 4.2. A Firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm<sup>2</sup>)

| Örnek Noktaları<br>(A)     | A.M.B. |      |      | <i>Enterobacteriaceae</i> |      |      | <i>Pseudomonas</i><br>spp. |      |      | <i>Bacillus</i> spp. |      |      |
|----------------------------|--------|------|------|---------------------------|------|------|----------------------------|------|------|----------------------|------|------|
|                            | n      | Ort. | SD   | n                         | Ort. | SD   | n                          | Ort. | SD   | n                    | Ort. | SD   |
| <i>Su*</i>                 | 6      | 2,60 | 0,82 | 6                         | 0,89 | 0,97 | 6                          | 0,84 | 0,81 | 6                    | 1,89 | 0,79 |
| <i>Çiğ Süt Tankı</i>       | 6      | 2,56 | 0,65 | 6                         | 1,30 | 0,52 | 6                          | 1,83 | 1,44 | 6                    | 1,94 | 1,0  |
| <i>Balans Tankı</i>        | 6      | 2,10 | 0,56 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                          | T.E. | T.E. | 6                    | 1,69 | 0,69 |
| <i>Plastik Boru</i>        | 6      | 3,36 | 0,54 | 6                         | 0,67 | 0,57 | 6                          | 0,73 | 0,63 | 6                    | 2,60 | 0,88 |
| <i>SS Boru</i>             | 6      | 1,98 | 0,57 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                          | 0,33 | 0,57 | 6                    | 1,81 | 0,73 |
| <i>Bulgar teknesi</i>      | 6      | 3,3  | 1,37 | 6                         | 2,38 | 2,06 | 6                          | 2,08 | 1,94 | 6                    | 2,88 | 1,69 |
| <i>Cendere Bezi</i>        | 6      | 2,36 | 0,65 | 6                         | 1,56 | 1,35 | 6                          | 1,54 | 1,34 | 6                    | 1,85 | 0,78 |
| <i>Bıçak</i>               | 6      | 2,67 | 0,71 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                          | 0,73 | 1,25 | 6                    | 2,23 | 0,68 |
| <i>Teleme Kırma Bıçağı</i> | 6      | 1,50 | 0,65 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                          | T.E. | T.E. | 6                    | 1,62 | 0,65 |
| <i>Duvar</i>               | 6      | 3,92 | 1,03 | 6                         | 2,74 | 2,37 | 6                          | 2,06 | 2,09 | 6                    | 2,73 | 0,76 |
| <i>Drenaj</i>              | 6      | 6,07 | 1,50 | 6                         | 5,60 | 0,94 | 6                          | 4,41 | 1,56 | 6                    | 6,22 | 1,42 |
| <i>Üretim Personel</i>     | 6      | 2,36 | 0,54 | 6                         | 1,25 | 1,08 | 6                          | 0,98 | 0,85 | 6                    | 1,92 | 0,80 |
| <i>Dolum Personel</i>      | 6      | 3,01 | 1,23 | 6                         | 1,06 | 1,09 | 6                          | 1,32 | 1,14 | 6                    | 2,07 | 1,04 |
| <i>Salamura Tankı</i>      | 6      | 3,70 | 1,59 | 6                         | 0,76 | 1,32 | 6                          | 0,72 | 0,63 | 6                    | 3,16 | 1,72 |
| <i>Maya Maşrapası</i>      | 6      | 2,20 | 0,85 | 6                         | 1,40 | 1,63 | 6                          | 1,76 | 1,66 | 6                    | 2,04 | 0,75 |

\*logkob/ml

T.E.: Tespit Edilemedi.

Çizelge 4.3. B firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm<sup>2</sup>)

| Örnek Noktaları<br>(B)     | A.M.B. |      |      | <i>Enterobacteriaceae</i> |      |      | <i>Pseudomonas</i><br>spp. |      |      | <i>Bacillus</i> spp. |      |      |
|----------------------------|--------|------|------|---------------------------|------|------|----------------------------|------|------|----------------------|------|------|
|                            | n      | Ort. | SD   | n                         | Ort. | SD   | n                          | Ort. | SD   | n                    | Ort. | SD   |
| <i>Su*</i>                 | 6      | 2,80 | 0,21 | 6                         | 0,51 | 0,89 | 6                          | 0,59 | 0,52 | 6                    | 1,51 | 0,58 |
| <i>Çiğ Süt Tankı</i>       | 6      | 2,58 | 0,52 | 6                         | 1,77 | 0,95 | 6                          | 0,90 | 1,55 | 6                    | 2,15 | 0,54 |
| <i>Balans Tankı</i>        | 6      | 2,42 | 0,23 | 6                         | 0,68 | 1,18 | 6                          | T.E. | T.E. | 6                    | 2,05 | 0,84 |
| <i>Plastik Boru</i>        | 6      | 2,77 | 0,71 | 6                         | 1,39 | 1,38 | 6                          | 0,53 | 0,92 | 6                    | 2,23 | 0,63 |
| <i>SS Boru</i>             | 6      | 2,41 | 0,43 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                          | 0,65 | 1,13 | 6                    | 1,82 | 0,71 |
| <i>Bulgar teknesi</i>      | 6      | 3,48 | 0,36 | 6                         | 1,92 | 0,89 | 6                          | 1,54 | 1,37 | 6                    | 2,75 | 1,04 |
| <i>Cendere Bezi</i>        | 6      | 3,06 | 0,35 | 6                         | 0,76 | 0,68 | 6                          | T.E. | T.E. | 6                    | 1,96 | 0,90 |
| <i>Bıçak</i>               | 6      | 3,61 | 0,25 | 6                         | 1,57 | 0,40 | 6                          | 0,46 | 0,81 | 6                    | 2,38 | 0,68 |
| <i>Teleme Kırma Bıçağı</i> | 6      | 2,61 | 0,78 | 6                         | 0,94 | 0,89 | 6                          | 0,47 | 0,81 | 6                    | 2,37 | 0,51 |
| <i>Duvar</i>               | 6      | 3,37 | 0,58 | 6                         | 3,88 | 3,38 | 6                          | 2,10 | 3,63 | 6                    | 2,61 | 0,41 |
| <i>Drenaj</i>              | 6      | 6,84 | 0,51 | 6                         | 0,90 | 0,85 | 6                          | 2,14 | 0,15 | 6                    | 6,77 | 0,67 |
| <i>Üretim Personel</i>     | 6      | 3,03 | 0,81 | 6                         | 0,67 | 0,57 | 6                          | 0,37 | 0,64 | 6                    | 2,30 | 0,44 |
| <i>Dolum Personel</i>      | 6      | 4,30 | 0,58 | 6                         | 1,88 | 0,75 | 6                          | 1,27 | 1,20 | 6                    | 3,26 | 0,57 |
| <i>Salamura Tankı</i>      | 6      | 3,72 | 1,08 | 6                         | 1,83 | 1,67 | 6                          | 1,90 | 1,66 | 6                    | 2,57 | 1,69 |
| <i>Maya Maşrapası</i>      | 6      | 3,34 | 1,18 | 6                         | 1,32 | 1,27 | 6                          | 0,87 | 0,39 | 6                    | 2,67 | 1,34 |

\*logkob/ml

T.E.: Tespit Edilemedi.

Çizelge 4.4. C firması temizlik sonrası yüzey mikrobiyal yükü (logkob/100cm<sup>2</sup>)

| Örnek Noktaları<br>(C)     | A.M.B. |      |      | <i>Enterobacteriaceae</i> |      |      | <i>Pseudomonas spp</i> |      |      | <i>Bacillus spp.</i> |      |      |
|----------------------------|--------|------|------|---------------------------|------|------|------------------------|------|------|----------------------|------|------|
|                            | n      | Ort. | SD   | n                         | Ort. | SD   | n                      | Ort. | SD   | n                    | Ort. | SD   |
| <i>Su*</i>                 | 6      | 2,06 | 0,81 | 6                         | 0,33 | 0,57 | 6                      | 0,80 | 0,38 | 6                    | 1,58 | 0,57 |
| <i>Çiğ Süt Tankı</i>       | 6      | 2,00 | 1,00 | 6                         | 1,27 | 0,43 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 2,47 | 2,03 |
| <i>Balans Tankı</i>        | 6      | 1,47 | 0,82 | 6                         | 0,84 | 0,46 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 1,63 | 1,09 |
| <i>Plastik Boru</i>        | 6      | 1,62 | 0,65 | 6                         | T.E. | T.E. | 6                      | 0,79 | 0,37 | 6                    | 1,18 | 1,08 |
| <i>SS Boru</i>             | 6      | 1,06 | 1,01 | 6                         | 0,33 | 0,27 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 0,73 | 0,63 |
| <i>Bulgar teknesi</i>      | 6      | 1,35 | 0,60 | 6                         | 0,69 | 0,20 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 0,51 | 0,37 |
| <i>Cendere Bezi</i>        | 6      | 1,40 | 0,53 | 6                         | 0,56 | 0,38 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 0,90 | 0,85 |
| <i>Bıçak</i>               | 6      | 2,71 | 1,62 | 6                         | 1,24 | 1,20 | 6                      | 0,40 | 0,27 | 6                    | 1,93 | 1,12 |
| <i>Teleme Kıрма Bıçağı</i> | 6      | 2,40 | 1,45 | 6                         | 1,24 | 0,40 | 6                      | 1,62 | 0,80 | 6                    | 1,71 | 0,83 |
| <i>Duvar</i>               | 6      | 2,46 | 1,54 | 6                         | 1,73 | 1,54 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 2,22 | 1,09 |
| <i>Drenaj</i>              | 6      | 4,22 | 1,92 | 6                         | 3,31 | 2,96 | 6                      | 2,17 | 1,76 | 6                    | 4,99 | 1,93 |
| <i>Üretim Personel</i>     | 6      | 2,65 | 0,37 | 6                         | 1,22 | 1,11 | 6                      | 1,33 | 1,30 | 6                    | 2,20 | 0,70 |
| <i>Dolum Personel</i>      | 6      | 3,19 | 1,24 | 6                         | 1,22 | 1,11 | 6                      | 0,43 | 0,33 | 6                    | 2,30 | 0,78 |
| <i>Salamura Tankı</i>      | 6      | 3,12 | 0,35 | 6                         | 1,09 | 1,03 | 6                      | T.E. | T.E. | 6                    | 2,55 | 0,77 |
| <i>Maya Maşrapası</i>      | 6      | 2,80 | 0,32 | 6                         | 1,06 | 1,04 | 6                      | 0,55 | 0,33 | 6                    | 1,98 | 1,55 |

\*logkob/ml

T.E.: Tespit Edilemedi.

#### 4.1.2.1. Yüzeylerden Alınan Örneklerin Aerobik Mezofilik Bakteri Yükleri

Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'de görüldüğü gibi çalışma süresi boyunca genel olarak yüzeylerin Aerobik Mezofilik Bakteri (AMB) sayısı 1,06-6,84 log kob/100 cm<sup>2</sup> arasında değiştiği tespit edilmiştir. A firmasında en düşük AMB değerine sahip yüzey teleme kırma bıçakları olduğu tespit edilmişken; B ve C firmalarında en düşük AMB yüküne sahip yüzey pastörize sütün Bulgar teknelerine ulaşımını sağlayan plastik boruların sahip olduğu görülmüştür. Temelli ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada Bursa yöresinde bir beyaz peynir firmasının üretim hattında kontaminasyon noktalarının tespiti yapılmıştır. Çalışmada genel AMB yükünü cendere bezinde en düşük (1,3 log kob/cm<sup>2</sup>), üretim bıçağında ise en yüksek düzeyde (5,24 log kob/cm<sup>2</sup>) tespit edilmiştir. Çalışmamızda üretim alanında ortam sıcaklığı ve nemi nedeniyle gerçekleşebilecek buharlaşma, ayrıca drenaj temizliğinin basınçlı sular ile yapılması durumuna aerosoller yolu ile ürün için tehlike yaratabilecek olan drenajların AMB yükleri de incelenmiş; beklendiği gibi bu yüzeylerin yüklerinin oldukça

yüksek olduğu görülmüştür. Temelli ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada drenajın AMB yükü 4,82 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilirken; çalışmamızda yer alan firma A, B ve C'nin drenaj yükü sırasıyla 6,70; 6,84; 4,22 log kob/100 cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. Üretim hattı daha eski olan firma A ve B, daha yeni olan firma C drenajlarından elde edilen yükün Temelli ve ark. (2006) çalışmasında üretim hattı incelenen firmanın yükünden 1 logaritmik değer düşük olduğu belirlenmiştir.

Cendere bezi AMB yükü açısından firma C ile Temelli ve ark. (2006) çalışmasında elde edilen sonuç benzerlik gösterirken; üretim hattı daha eski olan firma A ve B'de bu yük 1,5 log kob/cm<sup>2</sup> seviyesinde tespit edilmiştir. Üretim bıçakları AMB yükü açısından ise Ezine peyniri üretisi üç firmanın durumunun daha iyi olduğu; yük UV kabini kullanan firma A ve C'de 1 logkob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde tespit edilirken firma B'de ise 1,5 logkob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde olduğu görülmüştür. Evrensel ve ark. (2001) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise mandıra düzeyindeki bir işletme yüzeylerinden alınan örneklerin AMB yükü genel itibari ile 6 logkob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Bu seviye, çalışmamızda en eski üretim hattına sahip firma A'nın yüzey yüklerinden bile oldukça fazladır.

İşletmelerde direkt gıda ile teması bulunmayan; fakat üretim alanında görülebilecek yoğunlaşma nedeniyle gıda için bir tehlikeye dönüşebilecek olan duvar yüzeylerinin AMB yükleri de belirlenmiştir. Her üç işletme tarafından da haftada bir kere temizlendiği belirtilen yüzeylerde yükün 2,46-3,92 log kob/100 cm<sup>2</sup> arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek yük, en eski üretim alanına sahip firma A'da gözlemlenirken; en düşük yük beklendiği gibi firma C'nin üretim alanında gözlemlenmiştir. Bu durum üretim alanının yeterli ölçüde temizlenemediğinin ve birikimli olarak bu yüzeylerde biyofilm varlığının bir kanıtı olarak görülebilir. Temelli ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada duvarın AMB yükü belirtilen mikrobiyal yükün altında olduğu tespit edilirken; İrkin (2010) tarafından yine Bursa yöresinde yapılan çalışmada çalışmamıza benzer olarak 2,71 log kob/cm<sup>2</sup> düzeyinde AMB yükü tespit edilmiştir. Aiad (2013) tarafından yapılan çalışmada; Mısır'da üretim yapan bir peynir fabrikasının duvarlarında 5 logkob/cm<sup>2</sup> düzeyinde AMB tespit edilmiştir. Bu değer en eski üretim alanına sahip firma A'nın duvarlarında tespit edilen düzeyden bile fazladır.

Bir diğer kontaminasyon kaynağı olan personel ellerindeki AMB yükü üretim ve dolum personelleri ellerinden alınan swap örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sırasında dolum personellerinin üretim personellerine göre temizliğine daha az özen gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle dolum personelinden alınan örneklerde AMB yükü daha

fazladır. Bu bir hijyen eksikliğine işaret etmektedir. Çalışmamızda elde edilen üretim personel eli AMB yüklerinin, benzeri bir çalışma olan Temelli ve ark. (2006) tarafından bulunan değerden daha az olduğu görülmüştür. Evrensel ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada ise işçi ellerinin AMB yükü 6 logkob/cm<sup>2</sup> seviyesinde olduğu görülürken, bu durum ülkemizde bu alanda çalışanların yıllar içinde el temizliği konusunda bilinç düzeyinde bir artışı işaret ettiği söylenebilir.

#### 4.1.2.2. Yüzeylerden Alınan Örneklerin *Enterobacteriaceae* Yükleri

*Enterobacteriaceae* birçok üyesi bağırsak orijinli olan, içinde önemli patojen bakteriler de bulunduran, Gram negatif ve çubuk şeklinde bir bakteri familyasıdır (Harrigan, 1998; Cullimore, 2000). Gıda işletmelerinde temizlik ve dezenfeksiyon işlemi sonrasında *Enterobacteriaceae*'nin yüzeylerde tespiti, bir kontaminasyon varlığına işaret olarak görülmektedir (Salo ve ark., 2006; Fadel and İsmail, 2009). Ayrıca *Enterobacteriaceae*'e ait bakteri türlerinin ürünlerde istenmeyen bir kokuya neden olabildiği de bilinmektedir (Delbès-Paus ve ark., 2012; Lucera ve ark., 2014).

Çalışmamızda tüm firmaların hemen tüm yüzeylerinde *Enterobacteriaceae* tespit edilmiştir. Firma A üretim hattı B ve C'ye daha eski olmasına rağmen yüzey yükleri diğerlerine oranla daha iyi bir düzeydedir. Çalışma boyunca firma A'da balans tankı, paslanmaz çelik boru, teleme kırma ve üretim bıçaklarında; B firmasında paslanmaz çelik boru, firma C'de plastik boru örneklerinde *Enterobacteriaceae* tespit edilememiştir. Evrensel ve ark. (2001) ve Temelli ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmalarda da tüm yüzeylerde *Enterobacteriaceae* tespit edilirken; İrkin (2010) tarafından dil peyniri üretim hattında duvar, Bulgar teknesi ve üretim ekipmanlarında *Enterobacteriaceae* tespit edilememiştir. Cherif-Antar ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada CIP uygulanan paslanmaz çelik yüzeylerde *Enterobacteriaceae*'e rastlanmıştır.

Çalışmamızda *Enterobacteriaceae* yükü en yüksek yüzeyler beklendiği gibi drenajlardır (4,22-6,84 log kob/100 cm<sup>2</sup>). Bu değer Temelli ve ark. (2006) ve İrkin (2010) tarafından yapılan çalışmalarda işletme drenajlarında tespit edilen *Enterobacteriaceae* yüklerinden fazla olduğu tespit edilmiştir. Yine Temelli ve ark. (2006) ve İrkin (2010), duvar yüzeylerinde *Enterobacteriaceae* tespit edilemezken; çalışmamızda üç firmanın duvar yüzeylerinde de *Enterobacteriaceae* tespit edilmiştir. Personel ellerinde *Enterobacteriaceae* yükü 0,68-1,88 log kob/100 cm<sup>2</sup> arasında değişirken; Evrensel ve ark. (2001) tarafından küçük ölçekte üretim yapan mandıralarda aynı yük 4 logkob/cm<sup>2</sup> seviyesinde tespit



edilmiştir. Temelli ve ark. (2006) ve İrkin (2010) tarafından yapılan çalışmalarda ise personel elinde bu çalışma ile benzer düzeylerde *Enterobacteriaceae* yükü tespit edilmiştir.

*Enterobacteriaceae* varlığının her üç firmanın hemen hemen tüm yüzeylerinde görülmesi, temizlik ve dezenfeksiyonun yeterli düzeyde yapılamadığının bir göstergesi olmuştur. Buna karşın bu çalışma süresince, firmalar ile yapılan paylaşımlar etkisini göstermiştir. Her üç firma için yüzeylerin *Enterobacteriaceae* yükü, üç dönemlik örnek alım süreci boyunca düşüş göstermiştir.

#### 4.1.2.3. Yüzeylerden Alınan Örneklerin *Pseudomonas* spp. Yükleri

*Pseudomonas* spp. Gram negatif, çubuk şeklinde, hareketli, toprak kökenli bir bakteri türüdür (Harrigan, 1998; Cullimore, 2000). *Pseudomonas* spp.'nin süt ürünlerinde istenmeyen kokuya sebep olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Delbès-Paus ve ark., 2012; Lucera ve ark., 2014). Çiğ sütte bulunabilen ve çevresel koşullara adapte olabilen bir bakteridir. Bu nedenle süt işletmelerinde sıklıkla izole edilen bir bakteri cinsi olup; düşük sıcaklıklarda gelişebilmektedir (Sharma ve Anand, 2002; Leriche ve ark., 2004; Roosi ve ark., 2016). Bu durumun en az 6 ay soğuk hava deposunda olgunlaştırılan Ezine peynirleri için ciddi bir problem yaratabileceği ön görülmektedir.

Bu çalışmada üretim hattı daha yeni olan firma C dışında, diğer iki firma yüzeylerinin hemen hepsinde *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir. Firma A'da balans tankı ve teleme kırma bıçağı yüzeyinde; firma B'de balans tankı ve cendere bezi yüzeylerinde *Pseudomonas* spp. tespit edilememiştir. *Pseudomonas* spp. yükünün en fazla olduğu yüzey her üç firma için de drenajlardır. Ayrıca her üç firma için duvar yüzeyleri, su örnekleri, alet-ekipman ve personel elinde de *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir. Çalışmamızı destekleyici olarak İrkin (2010) tarafından yapılan çalışmada işçi eli, işletme yerleri ve peynir örneklerinde *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir. Peynirde tespit edilen *Pseudomonas* spp.'nin genellikle su kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Carescosa ve ark., 2015; Rossi ve ark., 2016). Bunun yanısıra gıda ile temas eden yüzeylerde ve borularda da kontaminasyonun olabileceği belirlenmiştir (Sharma ve Anand, 2002). *Pseudomonas* türleri farklı pigmentler oluşturarak gıdaların yapısında ve renginde değişikliklere neden olabilen bakterilerdir (Carescosa ve ark., 2015; Caputo ve ark., 2015). Ayrıca düşük sıcaklıklarda ekzopolisakkarit üreterek biyofilm oluşturabilmektedirler (Caixeta ve ark., 2012, Rossi ve ark., 2016).

Chiesa ve ark. (2014) tarafından İtalya'da yapılan çalışmada, süt işletmesinin farklı noktalarından alınan yüzey örneklerinin % 18'inde, su örneklerinin ise % 83'ünde *Pseudomonas* spp saptanmıştır. Yapılan araştırmada ise A firmasından alınan yüzey

örneklerinin %54.7'sinde, firma B yüzey örneklerinin %19'unda ve firma C yüzey örneklerinin %21'inde *Pseudomonas* spp tespit edilmiştir. Her üç firmaya ait su örneklerinin ise tamamında *Pseudomonas* spp varlığı tespit edilmiştir.

#### 4.1.2.4. Yüzeylerden Alınan Örneklerin *Bacillus* spp. Yükleri

*Bacillus* spp. Gram pozitif, sporlu, çubuk şeklinde ve toprak kökenli bir bakteri türüdür (Harrigan, 1998; Cullimore, 2000). *Bacillus* spp. süt ve süt ürünleri üretim hatlarında kolaylıkla yerleşebilen ve son üründe kötü koku problemine sebep olabilen bir bakteri olduğu belirtilmektedir (Molva ve ark., 2009; Kumari ve Sarkar, 2014, 2016). *Bacillus* spp'nin üç firmanın üretim hatlarında da en çok izole edilen bakteri olduğu belirlenmiştir. A, B ve C işletmelerinden alınan tüm örneklerde *Bacillus* spp tespit edilmiştir (%100).

Her üç firma üretim hattında *Bacillus* spp. yükünün en fazla olduğu noktanın drenaj olduğu görülmüştür. A firmasında üç farklı zamanda yapılan örnekleme sırasında yüzeylerdeki *Bacillus* spp. sayısının giderek azaldığı; bununla birlikte salamura tankındaki *Bacillus* spp. kontaminasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç uygulanan temizlik ve dezenfeksiyonun salamura tankı için yeterli olmadığına göstermektedir.

Üç dönemlik örnekleme süreci boyunca B firmasının yüzey *Bacillus* spp. yükünde genel itibari ile azalma olduğu görülmüştür. İlk örnekleme sırasında *Bacillus* spp. yükünün en fazla olduğu tespit edilen maya maşrapası yükünün süreç boyunca giderek azaldığı belirlenmiştir. Firma örnekleme başlangıcında kuyu suyu kullanmakta ve bu nedenle *Bacillus* spp. yükü yine kuyu suyu kullanan firma A ile benzerlik göstermektedir. Üretim hattında *Bacillus* spp. yükü özellikle COP ile temizlenen yüzeylerde daha yoğun olarak tespit edilmiştir. Firma bu konuda önerilerimizi dinlemiş ve bulunduğu yerdeki şehir şebeke suyunu kullanmaya başlamış ve su hattında da iyileştirmeye gitmiştir.

C firması da kuyu suyu kullanmakta ve tarla içerisinde konumlandırılmış bulunmaktadır. Firma üretim hattının da başlıca problemi *Bacillus* spp.'dir. *Bacillus* spp. süt üretim hatlarında sıklıkla görülmekte olan bir bakteri olup; neden kaynaklandığı konusunda ortak bir kanıya varılamamıştır. Kaynağı olduğu öne sürülen noktalar ise toprak, su, ahıl tabanları, yem, toz, saman, hava, hayvan pisliği, kirli hayvan memesi ve sağım makinalarıdır (Coorevits ve ark., 2010). Sharma ve Anand (2002) tarafından süt işletmesi pilot tesisinde yürütülen çalışmada, üretim hatlarından genellikle karışık kültür halinde mikroorganizmaları izole ettiklerini ve izole edilen bakteri türlerinin büyük çoğunluğunun *Bacillus* spp. ait olduğu belirtmişlerdir (%25). Firma üretim hattı yüzeylerinden COP ile

temizlene yüzeylerde, CIP ile temizlenen yüzeylere oranla *Bacillus* spp. yükünün daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.2.5. Yüzeylerden Alınan Örneklerin *Listeria* spp. Yükleri

*Listeria* spp.; Gram pozitif, kokobasil şeklinde, son derece hareketli bir bakteri türüdür (Harrigan, 1998; Cullimore, 2000). İnsan sağlığı açısından oldukça tehlikeli olan *Listeria* spp.'nin varlığı özellikle süt ve süt ürünleri hatları için büyük önem taşımaktadır (Ferreira ve ark., 2013; Melo ve ark. 2015; Spanu ve ark., 2015). Bu nedenle çalışmamız sırasında varlığı araştırılmıştır. Firma A'nin üretim hattında su, çelik boru, plastik boru, Bulgar teknesi, duvar, drenaj ve salamura tankından  $1,0 \times 10^1 - 9,5 \times 10^1$  kob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde muhtemel *Listeria* spp. izole edilmiştir. Firma B'de ise su, paslanmaz çelik borular, plastik borular, bulgar tekneleri, üretim personeli, dolum personeli, duvar, drenaj, salamura tankı ve maya maşrapalarında  $1,0 \times 10^1 - 8,0 \times 10^2$  kob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde muhtemel *Listeria* spp. izole edilirken; firma C'nin üretim hattında da bıçaklar, üretim personeli eli, dolum personeli ve maya maşrapasında  $1,0 \times 10^1$  kob/100 cm<sup>2</sup> seviyesinde muhtemel *Listeria* spp. izole edilmiştir. Drenajlarda havada yayılma özelliği bulunan *Listeria* spp. tespit edilmiş olması, akış sırasında ve basınçlı su ile temizlik sırasında bu bakterilerin ortama bio aerosoller, yine üretim alanı sıcaklığı ve nem nedeni ile karışması, ürünü kontamine etme ve personel ve tüketici sağlığı açısından riskin varlığı konusunda büyük bir önem taşımaktadır.

Spanau ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, İtalya'da bulun 13 farklı peynir işletmesinde *Listeria* spp. varlığı araştırılmıştır. Araştırmacılar 13 işletmenin 12'sinde *Listeria* spp. varlığını tespit ederken; ilgili mikroorganizmalar %3 -%26 arasında değişen oranlarda *L.monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Yine aynı çalışmada, yapılan çalışma ile paralel olarak en büyük kontaminasyon kaynağının drenajlar olduğu belirtilmiştir. Melo ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise, gıda işleme yüzeylerinden özellikle yerler, drenaj kanalları, su, salamura, Bulgar teknesi, cendere bezi, kalıplar, bıçaklar, soğutucu ve donduruculardan *Listeria monocytogenes* izole edilebildiğini belirtmişlerdir. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda *L.monocytogenes*'in gıda üretim yüzeylerine tutunarak biyofilm oluşturabileceği belirtilmiştir (Melo ve ark., 2015; Beresford ve ark., 2001; Harvey ve ark., 2007). Yapılmış olan çalışmamızda ise benzer olarak su, Bulgar tekneleri, bıçaklar, drenajlar *Listeria* spp. varlığı tespit edilen yüzeyler olmuştur.

#### 4.1.2.6. Alınan Yüzey Örnekleri Yüklerinin Standart Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı ve Hızlı ATP-Biyoluminesans Metodu ile Karşılaştırılması

Gıda endüstrisi açısından hızın büyük önemi bulunmaktadır. Özellikle de süt ve süt ürünleri endüstrisi gibi hammaddesi kolay bozulabilen işletmelerde yüzeylerin kirliliğinin hızlı bir şekilde tespiti gereklidir. ATP-Biyoluminesans yöntemi, bakteriyal ATP'nin hızlı bir şekilde tespitini temel almaktadır. Bu yöntemde mikroorganizma yükü kullanılan bakteriyal ATP'si ile oluşan luminans ışımının değeri olan Relative Light Unit (RLU) olarak verilmektedir. Yüzeylerin mikrobiyal yükünün hızlı tespiti aynı zamanda biyofilm oluşabilecek yüzeylerin de hızlı tespit edilebilmesinin önünü açacaktır.

Çalışma sırasında her üç firma yüzeylerinin kirlilik durumu standart ve ATP-Biyoluminesans yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Firma yüzeylerinin aerobik mezofilik bakteri sayısı standart yöntem ile 1-6,53 logkob/cm<sup>2</sup> arasında değişirken; ATP-Biyoluminesans yöntemi kullanılarak aynı yüzeylerin mikrobiyal yükü 11-186265 RLU arasında değişmektedir (Çizelge 4.5). Yine çizelge 4.5'e bakılacak olursa; firma A için 14 örnekleme noktasından 5 adeti standart yöntem kullanılarak temiz olarak tespit edilirken; ATP-Biyoluminesans yöntemi kullanılarak 2 adet temiz yüzey olduğu tespit edilmiştir. Firma B üretim hattı yüzeyleri her iki yöntem kullanılarak da incelendiğinde, temiz olarak tanımlanacak yüzey bulunamamıştır. Firma C için standart yöntemle 9 adet temiz yüzey bulunurken; ATP-Biyoluminesans ile sadece 2 yüzey temiz bulunmuştur. Standart yöntem ve ATP-Biyoluminesans yöntemleri ile elde edilen yüzey genel yük miktarı sayısal verileri arasında bir korelasyon varlığı araştırılmış; korelasyonun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0,05$ ). Sırasıyla firma A, B ve C'nin Spearman korelasyon değeri ve kapa değerleri 0,507 ve 0,00; 0,518 ve 0,00; 0,622 ve 0,00 olarak belirlenmiştir. Kapa değerlerine göre uyumun gücü önemsizdir (Bilgen ve Doğan, 2017).

Osmani ve ark. (2014) tarafından yapılan ve üniversite kantinlerindeki yüzeylerin mikrobiyal yükünün araştırıldığı çalışmada ATP-Biyoluminesans yöntemi ile standart aerobik mezofilik bakteri sayımı yöntemi arasında korelasyon olduğu belirtilmiştir. İpek ve Demirel Zorba (2014) tarafından çalışmada lokum üretim hattı yüzeylerinde standart ve ATP-Biyoluminesans yöntemleri arasında korelasyon bulunamamış; fakat standart yöntem ile temiz bulunan yüzeyler ATP-Biyoluminesans ile az kirli veya kirli olarak bulunmuştur. Cais-Sokolín'ska ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise süt ürünleri üretim hattında bulunan 304 ve 316 çelik yüzeylerde standart ve ATP-Biyoluminesans yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların bizim çalışmamıza oldukça benzer olduğu görülürken; yöntemler arasında korelasyon bulunmuştur. Hızlı bir yöntem olan ATP-Biyoluminesans

yönteminin en önemli problemi organik kirlerden etkilenmesidir. Bu nedenle standart yöntem ile temiz olarak tespit edilen bir yüzey; ATP-Biyoluminesans yöntemi ile kirli olarak değerlendirilebilmektedir. ATP-Biyoluminesans yöntemiyle temiz olarak değerlendirilen bir yüzey; standart yöntem ile kirli olarak değerlendirilmemektedir. Bu nedenler ile ATP-Biyoluminesans yöntemi, gıda firmalarının üretim yüzeylerini hızlı değerlendirilmesi amacıyla uygun bir yöntem olarak değerlendirilebilmektedir (Ayçiçek ve ark., 2006; İpek ve Demirel Zorba, 2014; Osmani ve ark., 2014; Cais-Sokolin'ska ve ark., 2016).

Çizelge 4.5. ATP- Biyoluminesans ve standart metotlarının kullanımıyla yüzey yükleri

| Örnek Nokta-ları           | A                |          |        |             | B                |          |        |             | C                |          |       |             |
|----------------------------|------------------|----------|--------|-------------|------------------|----------|--------|-------------|------------------|----------|-------|-------------|
|                            | AMB <sup>a</sup> | Sonuç    | RLU    | Sonuç       | AMB <sup>a</sup> | Sonuç    | RLU    | Sonuç       | AMB <sup>a</sup> | Sonuç    | RLU   | Sonuç       |
| <i>Çiğ Süt Tankı</i>       | 2,62             | Kirli    | 5139   | Kirli       | 2,013            | Az Kirli | 752    | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 91    | Hafif Kirli |
| <i>Balans Tankı</i>        | 1,7              | Temiz    | 20     | Temiz       | 2,56             | Az Kirli | 176    | Hafif Kirli | 1,0              | Temiz    | 186   | Hafif Kirli |
| <i>Plastik Boru</i>        | 2,99             | Kirli    | 550    | Kirli       | 1,95             | Az Kirli | 2117   | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 12    | Temiz       |
| <i>SS Boru</i>             | 1,47             | Temiz    | 11     | Temiz       | 2,0              | Az Kirli | 2887   | Kirli       | 1,17             | Temiz    | 10    | Temiz       |
| <i>Bulgar teknesi</i>      | 2,0              | Az Kirli | 70     | Hafif Kirli | 3,08             | Kirli    | 2340   | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 96    | Hafif Kirli |
| <i>Cendere Bezi</i>        | 1,7              | Temiz    | 2026   | Kirli       | 3,08             | Kirli    | 2053   | Kirli       | 1,17             | Temiz    | 51    | Hafif Kirli |
| <i>Bıçaklar</i>            | 2,03             | Az Kirli | 178    | Hafif Kirli | 3,76             | Kirli    | 122133 | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 773   | Kirli       |
| <i>Teleme Kıрма Bıçağı</i> | 1,03             | Temiz    | 996    | Kirli       | 3,08             | Kirli    | 40790  | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 648   | Kirli       |
| <i>Duvar</i>               | 3,19             | Kirli    | 1266   | Kirli       | 3,08             | Kirli    | 1244   | Kirli       | 1,0              | Temiz    | 522   | Kirli       |
| <i>Drenaj</i>              | 4,95             | Kirli    | 1127   | Kirli       | 6,53             | Kirli    | 28682  | Kirli       | 5,57             | Kirli    | 21132 | Kirli       |
| <i>Üretim Personeli</i>    | 1,74             | Az Kirli | 4800   | Kirli       | 3,53             | Kirli    | 2340   | Kirli       | 2,24             | Az Kirli | 5487  | Kirli       |
| <i>Dolum Personeli</i>     | 1,74             | Az Kirli | 4800   | Kirli       | 3,96             | Kirli    | 2340   | Kirli       | 2,24             | Az Kirli | 5487  | Kirli       |
| <i>Salamura Tankı</i>      | 5,08             | Kirli    | 186251 | Kirli       | 3,72             | Kirli    | 160546 | Kirli       | 2,99             | Kirli    | 4080  | Kirli       |
| <i>Maya Maşrapası</i>      | 1,51             | Temiz    | 52     | Hafif Kirli | 2,47             | Az Kirli | 1007   | Kirli       | 2,82             | Kirli    | 2054  | Kirli       |

<sup>a</sup>logkob/cm<sup>2</sup>

#### 4.1.2.7. Alınan İşletme Suyu Örneklerinin Yükleri

Her üç işletmede kullanılan suyun AMB yükü, Dünya Sağlık Örgütü tarafından bir çok patojen bakterininin mezofilik karakterde olması nedeniyle önemsenmiştir (WHO, 2006). Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yönetmelikte ise içilebilir sular için AMB yükü sınırı ml için 20 koloni oluşturan birim olarak verilmiştir (Anonim, 2005). Her üç işletme sularında AMB yükünün belirlenen içilebilir su kalitesinden uzak olduğu tespit edilmiştir Bu durum hem ürün kalitesinin hem de temizlik ve dezenfeksiyon etkinliğinin düşmesine neden olabilecek bir duruma işaret etmektedir. AMB seviyesi A, B ve C firmalarında 1,03-1,40 log kob/ml arasında tespit edilmiştir. A firması suyun mikrobiyal yükünün azaltılması için ozonlama kullanırken; B firması UV kullanmakta ve klorlamakta, C firması ise sadece klorlamaktadır. Buna karşın *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. cinsi mikroorganizmalar tüm işletmelerdeki sularda tespit edilmiştir. Bu da yapılan işlemlerin yeterli olmadığını göstermektedir.

Su, gıda endüstrisinde önemli bir kontaminasyon kaynağıdır (Nerin ve ark., 2016). Bu nedenle suyun mikrobiyolojik kalitesinin periyodik analizinin yapılması, rutin inceleme yapılması hijyen ve gıda güvenliğinin önemli bir aktivitesidir (Kirby ve ark., 2003). Suya zaman içerisinde, insan kaynaklı kontaminasyon olabilir veya hayvansal fekal kontaminasyon ve temiz su sistemine kirli/kullanılmış su kaynağından bulaş olabilir. Su kalitesindeki bozulma önemli sorunlara neden olmaktadır. Ürünün kontaminasyonuna ve firmanın ekonomik kayıplarına neden olabilmektedir. Suyun klorlanması sıklıkla kullanılan dezenfeksiyon yöntemidir. Bununla birlikte klorun süt proteinlerince parçalandığı ve borularda aşınmalara neden olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2012; Burke ve ark., 2017).

Bakteriler, virüsler, protozoalar ve parazitleri içeren su orijinli mikroorganizmalar potansiyel hastalık kaynaklarıdır (WHO, 2006). Sularda en çok rastlanan mikroorganizmalar *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Alcaligenes* ve *Flavobacterium* türü bakterilerdir (Winkler and Nikoleski, 2012).

Burke ve ark., (2017) yaptıkları bir araştırmada bir firmanın kendine ait kuyu suyunun kalitesini 2 yıl boyunca incelemiştir. Aerobik mezofilik bakteri (AMB) sayımı 21, 30 ve 37°C'de yapılmıştır. Araştırmada ayrıca su örneklerinin koliform, *Esheria coli* ve *Enterococcus* spp. yükleri de araştırılmıştır. Araştırmacılar 21 ve 37°C'deki sayımların 1. yılda 0,91 kob/mL ve 0,76 kob/mL olarak tespit ederken; 2. yılda 3,35 kob/mL ve 1,77 kob/mL'ye çıktığını belirlemişlerdir. Aylık olarak değerlendirme yapıldığında 21°C'deki yükün en yüksek elde edildiği ayın ağustos olduğunu belirlenirkenmiştir. 30°C'deki sayım sonuçlarının mart ayından aralık ayına kadar artış gösterdiği; en yüksek değerlerin eylül ayında

saptandığını belirlemişlerdir. 37°C'deki AMB sayısının ise Temmuz ve Ağustos da en yüksek değerine çıktığını tespit edilmiştir. Yine koliform, *E.coli* ve *Enterococcus* spp. sayıların en yüksek olduğu ayın sıcaklıklarında en yüksek olduğu Ağustos ayında görüldüğü bildirilmiştir.

Yapılan çalışmada, su örneklerinin AMB sayısının 2,06-2,80 log kob/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek AMB sayısı firma B'de tespit edilirken; sadece klor ile suyun mikrobiyal yükünü azaltmaya çalışan firma örneklem süreci sırasında kuyu suyu kullanımını bırakarak şehir şebeke suyu kullanımını tercih etmiştir. Fekal bulaşı indikatörü olan mikroorganizmaların da içinde bulunduğu *Enterobacteriaceae*, her üç firmanın su örneklerinde de görülmüştür (0,34-0,90 log kob/mL). Yine her üç firmadan alınan su örneklerinde 0,30-0,42 log kob/ml arasında *Pseudomonas* spp. ve 0,76-0,95 log kob/ml arasında *Bacillus* spp. varlığı da tespit edilmiştir (Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4). Firma B'nin su örneklerinde şüpheli *Listeria* spp. varlığı da tespit edilmiştir. *Listeria* spp. varlığı firmanın kuyu suyu kullanımı sırasında tespit edilmiştir.

Her üç firma tarafında uygulanan mikroorganizma yükünün azaltılmasına yönelik işlemlerin yetersiz olduğu çalışma sırasında ortaya çıkmıştır. Su örneklerinde *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Listeria* spp. ve *Enterobacteriaceae*'nin su örneklerde tespit edilebilmesinde fabrikaların tarlaların ortasında olmasının, etrafta hayvan ağıllarının olmasının, yer altı suyuna kontaminasyonların fazla olmasında etkili olduğu düşünülmüştür.

#### **4.1.2.8. İşletme Üretim ve Dolum Alanları Hava Örneklerinin Mikrobiyal Yüklerinin Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında üretim alanı ve dolum alanlarında hava örnekleri alınarak, havanın toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı yükü incelenmeye çalışılmıştır. Üç firmanın da üretim ve dolum bölümleri havalarının aerobik mezofilik bakteri sayısı yük miktarı da önemli bir kontaminasyon kaynağı olması nedeniyle incelenmiştir. Firma A, B ve C üretim alanı havası ve dolum havası aerobik mezofilik bakteri sayısı Çizelge 4.6'da verilmiştir. Her üç firma için de dolum bölümü aerobik mezofilik bakteri sayısı üretim bölümüne oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yaklaşık 24 saat boyunca dolum alanında teneke kutular içinde açık bırakılan ürünler açısından bu bölümdeki aerobik mezofilik bakteri sayısı büyük bir önem taşımaktadır.

Çöl ve Aksu (2007) tarafından yapılan çalışmada havada bulunan mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunun küf ve mayalar olduğu belirtilmektedir. Hava kaynaklı mikroorganizmalar toz gibi katı partiküllere veya aerosollere tutunarak havada

tutunabilmektedir. Hava yolu ile ürünlere kontamine olabilen bakteri türleri arasında *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Coryneform* spp. öne çıkmaktadır. *Listeria monocytogenes*'inde aerosollerde uzun süre canlı kalabildiği bildirilmiştir. İşletmelerdeki hava kaynaklı mikroorganizmaların personel, havalandırma, iklimlendirme, ambalaj, dış ortam havası kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (Çöl ve Aksu, 2007; Barancelli ve ark. 2014; Dalmaso ve Jordan, 2014; Melo ve ark. 2015).

Çizelge 4.6. Firma A, B ve C üretim ve dolun havası aerobik mezofilik bakteri sayısı

| Firma | Üretim Hava (kob/m <sup>3</sup> ) |                      |                      | Dolum Hava (kob/m <sup>3</sup> ) |                      |                     |
|-------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------|
|       | 1                                 | 2                    | 3                    | 1                                | 2                    | 3                   |
| A     | 1,34x10 <sup>2</sup>              | 6,9x10 <sup>1</sup>  | 7,0x10 <sup>1</sup>  | 2,96x10 <sup>2</sup>             | 1,12x10 <sup>2</sup> | 1,0x10 <sup>2</sup> |
| B     | 1,5x10 <sup>2</sup>               | 4,92x10 <sup>2</sup> | 1,78x10 <sup>2</sup> | 5,9x10 <sup>1</sup>              | 1,3x10 <sup>2</sup>  | 1,0x10 <sup>2</sup> |
| C     | 1,98x10 <sup>3</sup>              | 4,0x10 <sup>1</sup>  | 1,5x10 <sup>1</sup>  | 7,22x10 <sup>2</sup>             | 3,8x10 <sup>1</sup>  | 2,0x10 <sup>1</sup> |

Araştırmacılar tarafından süt işletmelerinde hava yolu ile kontaminasyonun engellenebilmesi için bazı öneriler yapılmıştır. Bu önerilerin ilki, çiğ sütün işletmeye alınması sırasında uygulamaların ıslak yüzeylerde hava kabarcıklarının patlamasını en aza indirecek şekilde yapılmasıdır. Aksi takdirde bio-aerosol oluşumu gerçekleşebilmektedir. Biyofilm oluşturan bakteriler zemin, duvar, taşıyıcı bant gibi ıslak yüzeylere rahatlıkla tutunabilmekte çoğalıp kolonize olabilmektedir. İşletmedeki atık su giderleri yeterli değilse, zemin basınçlı su ile temizleniyorsa aerosoller diğer yüzeylere mikroorganizmaları taşıyabilmektedir. Bir kere aerosol oluşumu gerçekleştiğinde, ortam havasının normal seviyelere gelmesi 40 dk sürmektedir (Al-Dagal ve Fung, 1990; Moslert ve Jooste, 2002; Kure ve ark., 2004; Temelli ve ark., 2006; Irkin, 2010).

İşletme içinde ise ürünlerin hava ile temas ettiği yerlerdeki mikroorganizma bulaşını azaltmak için iyi bir havalandırma gerekmektedir. Havalandırma ile üretim sırasında salınan nem uzaklaştırılabilir. Havalandırma yoğunlaşmayı ve buna bağlı küf gelişimini engelleyebilir (Çöl ve Aksu, 2007).

Radmore ve ark. (1988) tarafından yapılan bir çalışmada havanın mikrobiyal yükü ile ürünün mikrobiyal yükü arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Al-Dagal ve Fung, 1990). Temelli ve ark. (2006) ise, Bulgar teknesinde bulunan sütün ve pıhtının küf-maya



yükü üzerinde üretim alanı havasının yükünün etkisinin dikkat çekici düzeyde olduğunu belirtmiştir. Irkin (2010), üretim alanı havasının mikrobiyal kalitesinin önemini vurgularken; kontaminasyonun engellenmesi için hava filtresi kullanımını önermektedir.

Peynir işletmelerindeki havanın aerobik mezofilik bakteri sayısının 200 kob/m<sup>3</sup>'ün altında olması yeterli kabul edilmektedir. 2000 kob/m<sup>3</sup>'ün üstü ise yetersiz olarak kabul edilmektedir. Maya-küf yükü açısından ise <100 kob/m<sup>3</sup> yeterli, >1000 kob/m<sup>3</sup> yetersiz olarak nitelendirilmektedir (Luck ve Gavron, 1990; Özer ve Kerekeş, 2015).

Literatürden elde edilen veriler kullanıldığında A ve B firmasında dolun alanı hava örnekleri ilk örneklemede mikrobiyal yük açısından yeterli kabul edilen sınırdan yüksek (2,96x10<sup>2</sup> kob/m<sup>3</sup> ve 5,90x10<sup>2</sup> kob/m<sup>3</sup>) bulunmuştur. B firmasının üretim alanı hava örneklerinin mikrobiyal yükünün ise ilk örnekleme göre 3 kat arttığı, üçüncü örneklemede ise azalarak sınırdan kaldığı (1,8x10<sup>2</sup> kob/m<sup>3</sup>) gözlenmiştir. Buna karşın C firmasının üretim alanı havasının mikrobiyal yükü ilk örneklemede yetersiz bulunurken (1,99x10<sup>3</sup>kob/m<sup>3</sup>) ve dolun havasının yükünün istenilen seviyeden yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Fakat yapılan diğer örnekleme her iki alanda da havadaki mikrobiyal yükün 2x10<sup>2</sup> kob/m<sup>3</sup> seviyesinin altında kaldığı belirlenmiştir. Firma B'nin üretim ve dolun hava örneklerinin yükünün ikinci örnekleme döneminde azalış göstermesine, firmada ikinci örnekleme dönemi öncesinde yapılan inşaatın etkili olduğu düşünülmektedir. Aynı firmanın üçüncü örnekleme döneminde görülen azalış da bu duruma bir işaret olarak görülmektedir.

#### **4.1.3. Temizlik Prosedürü Uygulamasının Üretim Yüzeyleri Mikrobiyal Yüküne Etkisinin Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında uygulanan temizlik prosedürlerinin gerçek üretim hatlarının mikrobiyal yükü üzerinde etkisi incelenmiştir. Bu amaçla daha sonraki aşamalarda *invitro* ortamda geliştirilecek dezenfektan formüllerinin etkisinin görülmesi için kullanılacak olan temizlik prosedürü olarak firma B'ye ait CIP prosedürü seçilmiştir. Çizelge 4.7'de firma B'de belirlenen üretim hattı noktalarının mikrobiyal yükünün uygulanan temizlik prosedürü (CIP/COP) sonrası değişimi incelenmiştir.

Çizelge 4.7. Firma B yüzeylerinin temizlik uygulaması öncesi ve sonrası mikrobiyal yükü

| Örnek Noktaları (B)    | A.M.B. <sup>a</sup> |                     | <i>Enterobacteriaceae</i> <sup>a</sup> |                     | <i>Listeria spp.</i> <sup>a</sup> |                     | <i>Pseudomonas spp.</i> <sup>a</sup> |                     | <i>Bacillus spp.</i> <sup>a</sup> |                     |
|------------------------|---------------------|---------------------|--|---------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|
|                        | Önce                | Sonra               | Önce                                   | Sonra               | Önce                              | Sonra               | Önce                                 | Sonra               | Önce                              | Sonra               |
| Çiğ Süt Tankı          | 1,9x10 <sup>3</sup> | 5,0x10 <sup>2</sup> | 6,7x10 <sup>2</sup>                    | 1,0x10 <sup>1</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 2,4x10 <sup>2</sup>               | 1,0x10 <sup>2</sup> |
| Balans Tankı           | 6,1x10 <sup>3</sup> | 1,4x10 <sup>2</sup> | 1,0x10 <sup>1</sup>                    | <10                 | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 1,5x10 <sup>2</sup>               | 1,4x10 <sup>2</sup> |
| PlastikBoru            | 2,8x10 <sup>3</sup> | 1,3x10 <sup>3</sup> | 6,2x10 <sup>2</sup>                    | 6,0x10 <sup>2</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 1,0x10 <sup>3</sup>               | 9,0x10 <sup>2</sup> |
| SS Boru                | 1,3x10 <sup>3</sup> | 7,0x10 <sup>2</sup> | 4,5*10 <sup>2</sup>                    | <10                 | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 2,5x10 <sup>2</sup>               | 1,4x10 <sup>2</sup> |
| Bulgar teknesi         | 6,1x10 <sup>3</sup> | 4,5x10 <sup>3</sup> | 1,0x10 <sup>2</sup>                    | 1,4x10 <sup>1</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 1,6x10 <sup>4</sup>               | 6,0x10 <sup>3</sup> |
| Cendere Bezi           | 6,5x10 <sup>3</sup> | 2,6x10 <sup>3</sup> | 2,0x10 <sup>1</sup>                    | 1,0x10 <sup>1</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 6,5x10 <sup>2</sup>               | 1,3x10 <sup>2</sup> |
| Bıçaklar               | 6,2x10 <sup>3</sup> | 5,7x10 <sup>3</sup> | 8,0x10 <sup>1</sup>                    | 5,0x10 <sup>1</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 1,6x10 <sup>2</sup>               | 1,4x10 <sup>2</sup> |
| Teleme Kırma Bıçakları | 1,1x10 <sup>3</sup> | 5,0x10 <sup>1</sup> | 3,5x10 <sup>2</sup>                    | <10                 | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 8,0x10 <sup>1</sup>               | 2,0x10 <sup>2</sup> |
| Üretim Personeli       | 1,0x10 <sup>3</sup> | 1,4x10 <sup>3</sup> | 1,1x10 <sup>3</sup>                    | 1,0x10 <sup>1</sup> | 1,5x10 <sup>1</sup>               | 1,0x10 <sup>1</sup> | 2,1x10 <sup>2</sup>                  | 2,0*10 <sup>2</sup> | 5,0x10 <sup>1</sup>               | 3,0x10 <sup>3</sup> |
| Dolum Personeli        | 3,3x10 <sup>2</sup> | 4,0x10 <sup>2</sup> | 1,7x10 <sup>2</sup>                    | 1,0x10 <sup>1</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 4,8x10 <sup>2</sup>               | 2,5x10 <sup>2</sup> |
| Salamura Tankı         | 7,6x10 <sup>4</sup> | 2,0x10 <sup>4</sup> | 2,2x10 <sup>2</sup>                    | 2,0x10 <sup>2</sup> | <10                               | <10                 | <10                                  | <10                 | 4,5x10 <sup>3</sup>               | 1,5x10 <sup>3</sup> |
| Maya Maşrapası         | 3,8x10 <sup>4</sup> | 1,6x10 <sup>4</sup> | 4,0x10 <sup>3</sup>                    | 1,2x10 <sup>3</sup> | 2,0x10 <sup>2</sup>               | 1,0x10 <sup>2</sup> | 1,7x10 <sup>3</sup>                  | 1,3*10 <sup>3</sup> | 1,3x10 <sup>4</sup>               | 1,2x10 <sup>2</sup> |
| Drenaj                 | 3,2x10 <sup>7</sup> | 3,0x10 <sup>6</sup> | 2,8x10 <sup>6</sup>                    | 3,0x10 <sup>5</sup> | 2,3x10 <sup>2</sup>               | 1,0x10 <sup>2</sup> | <10                                  | <10                 | 4,0x10 <sup>8</sup>               | 1,6x10 <sup>7</sup> |

<sup>a</sup>kob/100cm<sup>2</sup>

Firma B'nin gerçek üretim hattında temizlik sonrası tüm yüzeylerde mikrobiyal yük azalmaktadır. CIP uygulaması yapılan yüzeylerde (çiğ süt tankı, balans tankı, çelik boru, plastik boru) genel olarak mikrobiyal yük 1 logaritma değerinde azalma göstermektedir. Firma B üretim hattında salamura tankı CIP sistemine dahil olmadığından mikrobiyal yükü aynı logaritma değerinde kalırken; paslanmaz çelik bir yüzey olmayan ve CIP sistemine dahil olan plastik boru mikrobiyal yükü de *Bacillus spp.* hariç aynı logaritmik değerde kalmıştır. *Enterobacteriaceae* yükü açısından firma B'nin CIP sistemi incelenecek olursa, çiğ süt tankı ve balans tankında mikrobiyal yük 1 logaritmik değer düşerken; çelik boruda 2 logaritmik değer ve plastik boruda ise 1 logaritmik değerden az miktarda düşüş göstermiştir. *Bacillus spp.* açısından ise sadece plastik boruda yük 1 logaritmik değer düşerken; paslanmaz çelik yüzeylerde ise 1 logaritmik değerden az miktarda düşüş göstermiştir. Genel itibarıyla COP ile temizlenen yüzeylerdeki mikrobiyal yük CIP ile temizlenen yüzeylerde daha yüksektir. Bu durum CIP sisteminin COP'ye oranla daha iyi bir temizlik sistemi olduğunu göstermektedir.

#### **4.1.4. Peynir Üreticisi Firmaların Üretim Hatlarındaki Yüzeylerden Elde Edilen İzolatların Tanımlanması, Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin ve Quorum Sensing Sinyal Varlıklarının İncelenmesi**

##### **4.1.4.1. Elde Edilen İzolatların Tanımlanması**

Su, hava ve diğer yüzeylerden *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacteriaceae* için kullanılan spesifik besiyerlerinde tipik koloni özelliği gösteren farklı kolonilerden seçilerek stoklanmıştır. İzolatlar, Nutrient Agar'da tek koloni düşürme tekniği kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen 398 koloni, koloni özellikleri ve Gram reaksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır. İzolatlardan büyük bir kısmının 281 adetinin maya, bakteri veya Gram pozitif çubuk ve Gram pozitif koklardan oluşan karışık kültür olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda bu sıklıkla görülen bir durumdur. Biyofilm matriksinde farklı mikroorganizmaların birlikte yaşam sürmesi sonucu elde edilen kolonilerde karışık mikroorganizma kültürü olması kaçınılmazdır.

Sharma ve Anand (2002) tarafından yapılan çalışmada pilot ölçekli süt ve süt ürünleri üretim hatlarından çok sayıda karışık kültür izole edilmiştir. Laurenco ve ark. (2011), Habimana ve ark. (2010) ve Simoes ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmalarda ise süt ürünleri üretim hatlarından karışık kültürler izole edilmiş; bu karışık kültürlerin aynı zamanda biyofilm üreticisi olduğu belirtilmiştir.

İlgili mikroorganizmaların izole edildikleri örnek noktası, cinsleri ve adetleri Çizelge 4.8'da verilmiştir. 2 kez çizim sonrasında saflaştırılamayan izolatlar ile devam edilmemiştir. Saf halde elde edilebilen izolatlar arasında benzer koloni, temel biyokimyasal testler açısından benzer özelliği gösteren izolatlardan sadece biri incelemeye alınmıştır. 111 adet bakteri kültürü saf olarak elde edilmiştir. Bunlardan 32 adeti Gram pozitif çubuk, 15 adeti Gram pozitif kokobasil, 54 adeti Gram negatif çubuk, 10 adeti ise Gram pozitif kok olarak ayrılmıştır. Çalışma sırasında karışık kültürler arasında çok sayıda *Streptococcus* spp.'e ait bakteriler saf kültür olarak elde edilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 4.8. İzole edilen bakterilerin örnek noktaları, cinsleri ve sayıları

| Örnek Noktası                 | FirmaA   | Firma B  | FirmaC  |
|-------------------------------|--|--|---|
| <b>Su</b>                     | <i>Pseudomonas</i> spp. (2);<br><i>Enterobacteriaceae</i> (2)  | <i>Bacillus</i> spp. (2); <i>Listeria</i> spp. (1)   | <i>Enterobacteriaceae</i> (1);<br><i>Bacillus</i> spp. (1)                                      |
| <b>Çiğ Süt Tankı</b>          | <i>Enterobacteriaceae</i> (1);<br><i>Streptococcus</i> spp. (1)  | <i>Pseudomonas</i> spp. (1);<br><i>Enterobacteriaceae</i> . (3)                              |   |
| <b>Balans Tankı</b>           |  | <i>Bacillus</i> spp. (1)   |   |
| <b>PlastikBoru</b>            | <i>Bacillus</i> spp. (1); <i>Listeria</i> spp.(1)  | <i>Bacillus</i> spp. (1)   | <i>Pseudomonas</i> spp. (2)   |
| <b>SS Boru</b>                | <i>Enterobacteriaceae</i> (1);<br><i>Streptococcus</i> spp. (1)  | <i>Streptococcus</i> spp. (1); <i>Bacillus</i> spp. (1)                                      |   |
| <b>Bulgar teknesi</b>         | <i>Pseudomonas</i> spp. (2)  | <i>Listeria</i> spp. (1)   |   |
| <b>Cendere Bezi</b>           | <i>Listeria</i> spp. (1); <i>Enterobacteriaceae</i> (1)  | <i>Bacillus</i> spp. (1)   | <i>Enterobacteriaceae</i> (1)   |
| <b>Bıçaklar</b>               | <i>Bacillus</i> spp. (1)   | <i>Bacillus</i> spp. (1)   | <i>Bacillus</i> spp. (2);<br><i>Enterobacteriaceae</i> (1)<br><br><i>Streptococcus</i> spp. (1) |
| <b>Teleme Kirma Bıçakları</b> | <i>Bacillus</i> spp. (1); <i>Listeria</i> spp.(1)  |  | <i>Bacillus</i> spp. (1);<br><i>Pseudomonas</i> spp. (2)  |
| <b>Duvar</b>                  | <i>Enterobacteriaceae</i> (7);<br><i>Streptococcus</i> spp. (1)<br><br><i>Bacillus</i> spp. (2)                        |  | <i>Listeria</i> spp (2);<br><i>Enterobacteriaceae</i> (1)                                       |
| <b>Drenaj</b>                 | <i>Enterobacteriaceae</i> (2);<br><i>Pseudomonas</i> spp. (2)<br><br><i>Bacillus</i> spp. (2); <i>Listeria</i> spp (2) | <i>Pseudomonas</i> spp. (1)  | <i>Pseudomonas</i> spp. (1);<br><i>Bacillus</i> spp. (1)  |
| <b>Üretim Personeli</b>       | <i>Enterobacteriaceae</i> (2)  | <i>Enterobacteriaceae</i> (2); <i>Bacillus</i> spp. (1)<br><br><i>Streptococcus</i> spp. (1) | <i>Enterobacteriaceae</i> (2)   |
| <b>Dolum Personeli</b>        | <i>Enterobacteriaceae</i> (1)  | <i>Enterobacteriaceae</i> (2); <i>Bacillus</i> spp. (2)                                      | <i>Enterobacteriaceae</i> (1)   |
| <b>Salamura Tankı</b>         | <i>Enterobacteriaceae</i> (1);<br><i>Pseudomonas</i> spp. (1)<br><br><i>Streptococcus</i> spp. (1)                     | <i>Pseudomonas</i> spp. (1)  | <i>Bacillus</i> spp. (1);<br><i>Pseudomonas</i> spp. (1)<br><br><i>Streptococcus</i> spp. (1)   |
| <b>Maya Maşrapası</b>         | <i>Enterobacteriaceae</i> (2)  | <i>Enterobacteriaceae</i> (2)  | <i>Bacillus</i> spp. (1);<br><i>Pseudomonas</i> spp. (1)<br><br><i>Streptococcus</i> spp. (1)   |

#### 4.1.4.2. Elde Edilen İzolatların API Kitleri ile Tanımlanması

Çalışmada elde edilen izolatlar Gram reaksiyonları, hücre şekilleri, oksidaz ve katalaz testleri sonuçlarına göre sınıflandırılmış; izole edildikleri besiyerlerine göre muhtemel *Listeria*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp. ve *Enterobacteriaceae* olarak gruplandırılmıştır.

Yapılan izolasyonlarda tipik *Listeria* spp. özelliği gösteren muhtemel izolatlardan 36 adet elde edilmiş, fakat bunların ancak 15 tanesi saflaştırılabilmektedir. 5 izolat aynı noktalardan izole edilen kolonilerden seçilmesi nedeniyle elenmiş; kalan 10 izolat API *Listeria* kitleri kullanılarak tanımlanmıştır. Saf olarak elde edilen *Listeria* spp. izolatların dağılımı Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Muhtemel *Listeria* spp. 'lerin 1'i *Listeria monocytogenes*, 1'i *L.ivanovi*,1'i *L.welshimeri*, 1'i *L.grayi*, 2'si *L.innocua* ve 4'ü *L.seeligeri* olarak tanımlanmıştır. Biyofilm pozitif olan *L.innocua* drenaj örneklerinden izole edilmiştir.

Çizelge 4.9. Şüpheli *Listeria* spp. izolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları

| Sayı | İzolasyon Yeri      | API Kiti            | Sonuç                          | Biyofilm       |
|------|---------------------|---------------------|--------------------------------|----------------|
| 1    | Su (A)              | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria ivanovii</i>       | Negatif        |
| 2    | Duvar               | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria seeligeri</i>      | Negatif        |
| 3    | Bulgar teknesi      | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria seeligeri</i>      | Negatif        |
| 4    | Duvar               | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria seeligeri</i>      | Negatif        |
| 5    | Duvar               | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria weishimeri</i>     | Negatif        |
| 6    | Drenaj              | API <i>Listeria</i> | <b><i>Listeria innocua</i></b> | <b>Pozitif</b> |
| 7    | Teleme Kırma Bıçağı | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria grayi</i>          | Negatif        |
| 8    | Plastik Boru        | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria seeligeri</i>      | Negatif        |
| 9    | Cendere Bezi        | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria innocua</i>        | Negatif        |
| 10   | Drenaj              | API <i>Listeria</i> | <i>Listeria monocytogenes</i>  | Negatif        |

A firması duvar, drenaj, çelik boru ve drenaj yüzeylerinden izole edilen izolatlar sırasıyla *Listeria welshimeri*, *L. innocua*, *L.innocua* ve *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. B firması su, Bulgar teknesi, plastik boru ve Bulgar teknesinden elde edilen izolatların sırası ile *Listeria ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi* ve *L. seeligeri* olduğu belirlenmiştir. C firmasından alınan izolatlar duvardan elde edilmiştir. Bu izolatların ikisi de *L. seeligeri* olarak tanımlanmıştır.

Dzieciol ve ark., (2016) drenajların *Listeria* spp ve özellikle *L. monocytogenes* için kaynak olabileceğini ifade etmiştir. Yapılan araştırmada drenaj yüzeyinden ve atık sudan birlikte örnek alınmıştır. Üretim alanındaki drenajdan laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.) asetik asit bakterileri (*A. spathodeae*, *A. tropicalis*, *G. oxydans*), *Pseudomonas* spp. olgunlaştırma ve dolum alanlarında, *Chryseobacterium* spp. ise üretim alanında bulunmuştur. Ayrıca *Janthinobacterium* spp. üretim alanındaki drenajlarda bulunmuştur. *Listeria* spp., özellikle *L.monocytogenes* drenaj ve drenaj sularından izole edilmiştir. Ayrıca Gram negatif bakterilerden *Serratia proteamaculans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *Aeromonas punctata* tespit edilmiştir.

Almeida ve ark., (2013)'de peynir üretim alanında süt alımı ve üretim alanlarında en çok peynir altı suyunun ayrıldığı alanlarda *Listeria monocytogenes* olduğunu belirtmiştir. Peynir yıkama alanlarında kullanılan fırçalarda *L. monocytogenes* tespit edilmiş olup basınçlı su ile temizlemede bunun havaya karıştığı ve ürünü tekrar kontamine edebileceği belirtilmektedir.

*Pseudomonas* türlerinin belirlenmesi için kullanılan CFC besiyerinden elde edilen toplam 95 izolatın 26 tanesi saf olarak elde edilebilmiş ve API NE ile tanımlanmıştır. Elde edilen izolatların firmalara göre dağılımı ve izole edildiği yerler Çizelge 4.10'da verilmiştir. Muhtemel 26 *Pseudomonas* spp.'nin 15 tanesi *Pseudomonas* spp.'ye ait olduğu tespit edilmiştir.

A firmasından elde edilen 11 izolat, maya maşrapası, Bulgar teknesi, salamura tankı, drenaj, su, dolum personelinden elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter junii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Mannheimia haemolytica*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* ve *P. alcaligenes* olarak tanımlanmıştır.

B firmasından elde edilen 8 izolat ise salamura tankı, çelik boru, çiğ süt tankı, plastik boru, su, Bulgar teknesi ve drenajdan elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Achromobacter xylosoxidans*, *P. stutzeri* olarak tanımlanmış, drenajda *Breviundimonas dimiuta* varlığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Şüpheli *Pseudomonas* spp. izolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları

| Sayı | İzolasyon Yeri      | API Kiti | Sonuç                                 | Biyofilm       |
|------|---------------------|----------|---------------------------------------|----------------|
| 1    | Maya Maşrapası      | API NE   | <i>Pseudomonas putida</i>             | Negatif        |
| 2    | Bulgar teknesi      | API NE   | <i>Acinetobacter junii</i>            | Negatif        |
| 3    | Teleme Kırma Bıçağı | API NE   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>   | Negatif        |
| 4    | Salamura Tankı      | API NE   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Negatif        |
| 5    | Maya Maşrapası      | API NE   | <i>Achromobacter xylosoxidans</i>     | Negatif        |
| 6    | Salamura Tankı      | API NE   | <b><i>Ochrobacterium anthropi</i></b> | <b>Pozitif</b> |
| 7    | Su                  | API NE   | <i>Pseudomonas luteola</i>            | Negatif        |
| 8    | Drenaj              | API NE   | <i>Acinetobacter junii</i>            | Negatif        |
| 9    | Salamura Tankı      | API NE   | <i>Sphingomonas paucimobis</i>        | Negatif        |
| 10   | Teleme Kırma Bıçağı | API NE   | <i>Acinetobacter junii</i>            | Negatif        |
| 11   | Salamura Tankı      | API NE   | <b><i>Mannheimia haemolytica</i></b>  | <b>Pozitif</b> |
| 12   | Plastik Boru        | API NE   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>   | Negatif        |
| 13   | Drenaj              | API NE   | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>        | Negatif        |
| 14   | Teleme Kırma Bıçağı | API NE   | <i>Pseudomonas sturtzeri</i>          | Negatif        |
| 15   | Drenaj              | API NE   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Negatif        |
| 16   | Su                  | API NE   | <i>Pseudomonas sturtzeri</i>          | Negatif        |
| 17   | Dolum Personel      | API NE   | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>        | Negatif        |
| 18   | Çelik Boru          | API NE   | <b><i>Pseudomonas sturtzeri</i></b>   | <b>Pozitif</b> |
| 19   | Bulgar teknesi      | API NE   | <i>Pseudomonas sturtzeri</i>          | Negatif        |
| 20   | Salamura Tankı      | API NE   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Negatif        |
| 21   | Çiğ Süt Tankı       | API NE   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Negatif        |
| 22   | Plastik Boru        | API NE   | <i>Achromobacter xylosoxidans</i>     | Negatif        |
| 23   | Su                  | API NE   | <i>Pseudomonas sturtzeri</i>          | Negatif        |
| 24   | Drenaj              | API NE   | <i>Breviundimonas dimiuta</i>         | Negatif        |
| 25   | Salamura Teknesi    | API NE   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Negatif        |
| 26   | Bulgar teknesi      | API NE   | <i>Pseudomonas sturtzeri</i>          | Negatif        |

C firmasından 7 izolat tanımlanmıştır. Bu izolatların 3 tanesi teleme kırma bıçağından, 1 tanesi maya maşrapası, 1 tanesi plastik boru, 1 tanesi sudan ve 1 tanesi drenajdan elde edilmiştir. Teleme kırma bıçaklarından izole edilen izolatlar *Stenotrophomonas maltophilia* olarak, *Acinetobacter junii* ve *Pseudomonas stutzeri* olarak tanımlanırken, plastik borudan izole edilen izolat *Stenotrophomonas maltophilia*, su örneğinden izole edilen izolat *Pseudomonas luteola*, drenajdan izole edilen izolat ise *Pseudomonas alcaligenes* olarak tanımlanmıştır.

VRBGA besiyerinde gelişen ve tipik *Enterobacteriaceae spp.* koloni özelliği gösteren izolatlar API 20E ile tanımlanmıştır. İzolatların firmalara göre dağılımı ve izole edildiği yerler Çizelge 4.11’de verilmiştir.

A firmasından elde edilen 14 izolat çiğ süt tankı (2), su (1), duvar (5), drenaj (2), üretim personeli (2), maya maşrapası (1) ve cendere bezi (1)’den elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla çiğ süt tankında *Klebsiella oxytoca*, su’da *Klebsiella pneumonia subsp. ozonae*, drenajda *Klebsiella oxytoca* ve *Enterobacter cloacea*, üretim personelinin ellerinde *Klebsiella pneumonia subsp. ozonae* ve *Enterobacter aerogenes*, maya maşrapasında *Klebsiella pneumonia*, cendere bezinde ise *Pasteurella pneumotropica* olarak tanımlanmıştır.

B firmasından elde edilen 8 izolat ise su (1), salamura tankı (1), çiğ süt tankı (1), teleme kırma bıçağı (1), maya maşrapası (2), üretim personeli (1) ve duvar (1)’den izole edilmiştir. Bunlar sırasıyla su ve çiğ süt tankından izole edilen izolatlar *Pantoea agglomerans*, salamura tankından alınan izolat *Citrobacter freundii*, teleme kırma bıçağından izole edilen izolat *Ochrobacterium anthropi*, maya maşrapasından elde edilen iki izolat *Aeromonas hydrophila*, olarak tanımlanmıştır. Üretim personelinin elinde *Klebsiella oxycota*, duvarda ise *Klebsiella pneumoniae* belirlenmiştir.

C firmasında ise 6 izolat; duvar (2), üretim personeli (2), su (1) ve üretimde kullanılan bıçaktan (1) alınmıştır. Duvardan alınan örnekler *Enterobacter cloacea* ve *Stenotrophomonas maltophilia*, üretim personelinden *Klebsiella pneumoniae* ve *Pasteurella pneumotropica*, bıçak izolatu ise *Ochrobacterium anthropi* olarak tanımlanmıştır.



Çizelge 4.11. Şüpheli *Enterobacteriaceae* İzolat kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları

| Sayı | İzolasyon Yeri      | API Kiti | Sonuç                                     | Biyofilm       |
|------|---------------------|----------|---|----------------|
| 1    | Çiğ Süt Tankı       | API E    | <i>Klebsiella oxytoca</i>                 | Negatif        |
| 2    | Drenaj              | API E    | <b><i>Klebsiella oxytoca</i></b>          | <b>Pozitif</b> |
| 3    | Salamura Tankı      | API E    | <i>Citrobacter freundii</i>               | Negatif        |
| 4    | Su                  | API E    | <i>Klebsiella pneumonia</i>               | Negatif        |
| 5    | Duvar               | API E    | <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 6    | Duvar               | API E    | <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 7    | Duvar               | API E    | <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 8    | Duvar               | API E    | <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 9    | Üretim Personeli    | API E    | <i>Klebsiella pneumonia subsp. ozanae</i> | Negatif        |
| 10   | Su                  | API E    | <i>Klebsiella pneumonia subsp. ozanae</i> | Negatif        |
| 11   | Üretim Personeli    | API E    | <i>Enterobacter cloacae</i>               | Negatif        |
| 12   | Duvar               | API E    | <b><i>Klebsiella pneumonia</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 13   | Drenaj              | API E    | <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 14   | Üretim personeli    | API E    | <b><i>Klebsiella pneumonia</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 15   | Çiğ Süt Tankı       | API E    | <i>Pantoea agglomerans</i>                | Negatif        |
| 16   | Maya Maşrapası      | API E    | <b><i>Aeromonas hydrophila</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 17   | Su                  | API E    | <i>Ochrobacterium anthropi</i>            | Negatif        |
| 18   | Teleme Kırma Bıçağı | API E    | <i>Ochrobacterium anthropi</i>            | Negatif        |
| 19   | Bıçak               | API E    | <i>Ochrobacterium anthropi</i>            | Negatif        |
| 20   | Maya Maşrapası      | API E    | <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>       | <b>Pozitif</b> |
| 21   | Maya Maşrapası      | API E    | <b><i>Aeromonas hydrophila</i></b>        | <b>Pozitif</b> |
| 22   | Çiğ Süt Tankı       | API E    | <b><i>Klebsiella oxytoca</i></b>          | <b>Pozitif</b> |
| 23   | Üretim personeli    | API E    | <i>Klebsiella oxytoca</i>                 | Negatif        |
| 24   | Duvar               | API E    | <b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>      | <b>Pozitif</b> |
| 25   | Duvar               | API E    | <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>       | <b>Pozitif</b> |
| 26   | Üretim personeli    | API E    | <i>Pasteurella pneumotropica</i>          | Negatif        |
| 27   | Cendere Bezi        | API E    | <i>Pasteurella pneumotropica</i>          | Negatif        |
| 28   | Duvar               | API E    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>       | Negatif        |

Çizelge 4.12. Şüpheli *Bacillus* spp. kodları, API Kitleri ile tanımlama ve Congo Red Agar ile biyofilm oluşturma durumu sonuçları

| Sayı | İzolasyon Yeri      | API Kiti | Sonuç                                   | Biyofilm       |
|------|---------------------|----------|---|----------------|
| 1    | Drenaj              | API CH   | <i>Bacillus licheniformis</i>           | Negatif        |
| 2    | Balans Tankı        | API CH   | <i>Bacillus lentus</i>                  | Negatif        |
| 3    | Su                  | API CH   | <i>Bacillus firmus</i>                  | Negatif        |
| 4    | Bıçak               | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | <b>Pozitif</b> |
| 5    | Plastik Boru        | API CH   | <i>Bacillus licheniformis</i>           | <b>Pozitif</b> |
| 6    | Teleme Kırma Bıçağı | API CH   | <i>Bacillus lentus</i>                  | Negatif        |
| 7    | Duvar               | API CH   | <i>Bacillus licheniformis</i>           | Negatif        |
| 8    | Cendere Bezi        | API CH   | <i>Bacillus megaterium</i>              | Negatif        |
| 9    | Üretim Personeli    | API CH   | <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> | Negatif        |
| 10   | Çelik Boru          | API CH   | <i>Geobacillus stearothermophilus</i>   | Negatif        |
| 11   | Su                  | API CH   | <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> | Negatif        |
| 12   | Su                  | API CH   | <i>Bacillus cereus</i>                  | Negatif        |
| 13   | Drenaj              | API CH   | <i>Bacillus cereus</i>                  | Negatif        |
| 14   | Cendere Bezi        | API CH   | <i>Bacillus thuringiensis</i>           | Negatif        |
| 15   | Dolum Personel      | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | <b>Pozitif</b> |
| 16   | Maya Maşrapası      | API CH   | <i>Bacillus cereus</i>                  | Negatif        |
| 17   | Bıçak               | API CH   | <i>Bacillus firmus</i>                  | <b>Pozitif</b> |
| 18   | Üretim Personeli    | API CH   | <i>Bacillus firmus</i>                  | Negatif        |
| 19   | Plastik Boru        | API CH   | <i>Bacillus firmus</i>                  | Negatif        |
| 20   | Bıçak               | API CH   | <i>Bacillus lentus</i>                  | <b>Pozitif</b> |
| 21   | Salamura Tankı      | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | <b>Pozitif</b> |
| 22   | Maya Maşrapası      | API CH   | <i>Bacillus megaterium</i>              | Negatif        |
| 23   | Su                  | API CH   | <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> | Negatif        |
| 24   | Duvar               | API CH   | <i>Bacillus megaterium</i>              | Negatif        |
| 25   | Plastik Boru        | API CH   | <i>Bacillus smithii</i>                 | Negatif        |
| 26   | Drenaj              | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | Negatif        |
| 27   | Teleme Kırma Bıçağı | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | Negatif        |
| 28   | Plastik Boru        | API CH   | <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> | Negatif        |
| 29   | Duvar               | API CH   | <i>Bacillus subtilis</i>                | Negatif        |
| 30   | Maya Maşrapası      | API CH   | <i>Bacillus coagulans</i>               | <b>Pozitif</b> |
| 31   | Drenaj              | API CH   | <i>Bacillus pumilus</i>                 | Negatif        |
| 32   | Bıçak               | API CH   | <i>Bacillus megaterium</i>              | Negatif        |

*Bacillus* türleri için özel olan kromojenik bir besiyeri olan Hicrome *Bacillus* Agar'dan elde edilen toplam 35 izolat besiyerinde meydana getirdikleri renklere göre sınıflandırıldıklarında pembe renkli koloniler *B. thuringensis* olarak, sarı renkli koloniler *B. megaterium*, mavi renkli koloniler *B. cereus* ve ortası yeşil kenarı beyaz renkli koloniler *B. subtilis* olarak tanımlanmıştır (Ek 4).

Buna karşın API CH ile yapılan tanımlamalarda *Bacillus* besiyerinden izole edilen muhtemel *Bacillus* spp.'lerin 3 cinse (*Bacillus*, *Aneurinibacillus* ve *Geobacillus* spp.) ait olduğu görülmüştür. Muhtemel 32 *Bacillus* spp.'nin 29'unun *Bacillaceae* familyasına 3'ünün *Paebacillaceae* familyasına ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

A firmasından elde edilen 13 izolat drenaj (3), plastik boru (2), teleme bıçağı (1), duvar (3), cendere bezi (1), üretim personeli (1), maya maşrapası (1) ve üretim bıçağı (1)'nden alınmıştır. Bunlar sırasıyla drenajda *Bacillus licheniformis*, *B.coagulans*, *Bacillus pumilus*; plastik boruda *Bacillus licheniformis* ve *B. simthii*; teleme bıçağında *Bacillus lentus*; duvarda *B. licheniformis*, *B. megaterium* ve *B. subtilis*; cendere bezinde *B. megaterium*; personel elinde *B. firmus*, maya maşrapasında ve bıçakta *B. megaterium* olarak tanımlanmıştır.

B firmasından elde edilen 9 *Bacillus* spp. izolatu ise balans tankı (1), su (3), bıçak (1), üretim personeli (1), çelik boru (1), plastik boru (1) ve dolum personelinden (1) alınmıştır. Elde edilen izolatlar sırasıyla balans tankında *Bacillus lentus*, su örneklerinden *B. firmus*, *B. cereus*, *A. aneurinilyticus*, bıçaktan *B. coagulans*, üretim personelinden *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, çelik borudan *Geobacillus stearothermophilus*, dolum personelinden *B. circulans* ve plastik boruda *B. firmus* olarak tanımlanmıştır.

C firmasında ise alınan 10 izolat tanımlanmıştır. Bunların izole edildiği alanlar drenaj (1), cendere bezi (1), maya maşrapası (2), bıçak (2), teleme bıçağı (1), salamura tankı (1), teleme kırma bıçağı (1), plastik boru (1), ve su'dur. Drenajdan elde edilen izolat *Bacillus cereus*, cendere bezinden elde edilen izolat *Bacillus thrungiensis*, maya maşrapasından elde edilen iki izolat *B. cereus* ve *B. coagulans*, bıçaktan elde edilen iki izolat *B. lentus* ve *B. firmus*, teleme kırma bıçağından, su ve plastik borudan elde edilen izolatlar *A. aneurinilyticus* ve salamura tankından elde edilen izolat *B. coagulans* olarak tanımlanmıştır.

Kalan 10 izolat ise çalışmalar sırasında karışık kültürlerden izole edilen, Nutrient Agar'da saflaştırılan ve mikroskop altında Gram pozitif kok şeklinde olarak tanımlanan bakterilerdir. Cullimore (2000), UMS (2015) ve IUMS tarafından 2005 yılında önerilen anahtarlar kullanılarak Gram pozitif kok şeklindeki bakteri izolatları tanımlanmıştır (Tindal ve ark., 2008) (Ek 1). Yapılan fenotipik tanımlama sonucunda, çiğ süt tankından elde edilen 1 izolatu oral tipte olduğu görülmüş ve *Streptococcus mitis* olarak tanımlanmıştır. Diş

çürüklerinde sıklıkla rastlanılan bakterinin hayvanın iyi bakılmaması nedeniyle kanına ve oradan sütüne bulaşmış olabileceği düşünülmektedir. Walsh ve ark (2012) tarafından yapılan bir çalışmada İrlanda’da bulunan bir çiftlikten dört ay boyunca çiğ süt, pastörize süt, peynir altı suyu, kazein gibi ürünler alınarak hakim microflora saptanmıştır. Çalışmada özellikle çiğ sütte hakim mikroorganizmalardan birinin *S.mitis* olduğu vurgulanmaktadır. Kalan isolatların dördünün enterokokal gruptan, beşinin ise laktik gruptan olduğu tespit edilmiştir. Salamura teknesi, cendere bezi, bıçak, çelik boru ve maya maşrapasından laktik gruptan olan *S.lactis* (2), *S.bovis* (1), *S.thermophilus* (2) bulunmuştur. Üretim personeli, duvar, maya maşrapası ve salamura teknesi enterokokal gruptan olan *Enterococcus faecalis* (3) ve *E.faecium* (1) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4,13). Walsh ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada da *S.mitis* yanı sıra *S.themophilus*, *Enterococcus faecium* ve *E.feacalis* süt ve süt ürünlerinden izole edilmiştir.

Çizelge 4.13. Firma yüzeylerinde izole edilen *Streptococcus* spp.’lerin tanımlanması

| Üretim Noktası   | Firma A                      | Firma B                     | Firma C                      |
|------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Çiğ Süt Tankı    | <i>Streptococcus mitis</i>   |                             |                              |
| Salamura Teknesi | <i>Enterococcus faecium</i>  | <i>Streptococcus lactis</i> |                              |
| Maya Maşrapası   |                              | <i>S.thermophilus</i>       | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Duvar            | <i>Enterococcus faecalis</i> |                             |                              |
| Üretim Personeli |                              |                             | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Bıçak            |                              |                             | <i>Streptococcus lactis</i>  |
| Çelik Boru       | <i>S.thermophilus</i>        |                             |                              |
| Cendere Bezi     | <i>Streptococcus bovis</i>   |                             |                              |

Yapılan araştırmalarda süt ürünlerinde yaygın olarak *Enterobacter* spp. (Salo ve ark., 2006), *Listeria* spp. (Waak ve ark., 2002) *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus* spp. (Sharma ve Anand, 2002; Rückert ve ark.,2004, Gopal ve ark.,2015), ayrıca *Pseudomonas* spp. (Wiedmann ve ark., 1999) tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özellikleri belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda *Bacillus* spp’nin işleme

ekipmanlarında ve ısı değiştiricilere tutunmuş halde bulunabildiği bildirilmiştir. Ayrıca *Bacillus* spp. bir hijyen indikatörü olarak nitendirilmekte olup; çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların ısıl işlem sonrası ürüne bulaş durumunu belirlemek için kullanılmaktadır. Pastörizatörlerin giriş ve çıkış kısımlarında biyofilm oluşumu saptanan çalışmalar mevcuttur. Sütün pastörizasyon işlemi çoğu zaman ortamdaki sporları yok etmek için yeterli değildir ve bu uygulamayla sadece vejetatif hücreler öldürülür. Temizleme işlemi *Bacillus* sporları üzerine etkili değildir ve bu sporlar paslanmaz elik yüzeyler üzerine tutunmaya devam edebilirler (Andersson ve ark., 1995; Burgess ve ark., 2010; Teke Gündüz, 2012).

Sharma ve Anand (2002) tarafından yapılan bir çalışmada özellikle süt ve süt ürünleri sanayisi için biyofilm oluşumunun HACCP kurulumu sırasında dikkate alınması gerekliliği vurgulanmıştır. Çalışmacılar biyofilm oluşumunun önemini ortaya koymak amacıyla Hindistan'da faaliyet gösteren bir süt ve süt ürünleri işletmesi ile bir pilot tesisin işleme hatlarındaki biyofilm oluşumunu incelemişlerdir. Belirledikleri çeşitli noktalardan alınan örneklerde biyofilm içerisinde *Bacillus* spp. nin çok baskın olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca örneklerden; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* ve *Proteus* türleri dışında *Esherichia coli* ve *Enterobacter aerogenes* izole etmişlerdir. Çalışmamızda ise her üç firmanın hemen tüm yüzey örneklerinde *Bacillus* spp. baskın olarak tespit edilmiştir.

Gündüz ve Tuncel (2006) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; bir dondurma üretim tesisinde biyofilm oluşumu incelenmiştir. Araştırmacılar tarafından üretim hattındaki yedi farklı noktadan biyofilm örneklerini 20 günlük bir periyotta iki defa alınmıştır. Çalışma sonucunda hatta en fazla biyofilmin paketleme makinesına ait olan taşıyıcı bantta oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hattan alınan biyofilm örneklerinde *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Esherichia* ve *Edwardsiella* gibi *Enterobactericea* ailesine ait bakteri türleri dışında *Aeromonas*, *Plesimonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas* veya *Alcaligenes* gibi Gram negatif türler ve de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* spp., laktik asit bakterileri olan *Streptococcus*, *Leuconostoc* veya *Pediococcus* spp. izole edilmiştir.

Temelli ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise Bursa bölgesinde faaliyet gösteren bir beyaz peynir üreticisi üretim hattında koagülaz pozitif *Staphylococcus*, koliform, *Enterobacteriaceae*, *Enterococci*, psikrofilik bakteriler, küf ve mayalar izole etmişlerdir. İrkın (2010) tarafından yine aynı yörede yapılan çalışmada ise dil peyniri üretim hattından *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Esherichia coli*, laktik asit bakterileri, *Pseudomonas* spp., küf ve maya izole edilmiştir.

Burgess ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada süt ve süt endüstrisinde görülebilen termofilik *Bacillus* spp. ve öneminden bahsedilmiştir. Çalışmada *Aneurinibacillus* ve *Geobacillus* spp.'lerin süt ve süt ürünleri hatlarında oldukça yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir. Toksin üretmeyen *Aneurinibacillus* ve *Geobacillus* spp.'lerin enzimleri ile birlikte asit üretimleri vasıtasıyla kötü koku oluşumuna sebep olabilecekleri bildirilmiştir. Biyofilm üretme eğilimi yüksek olan *Bacillus* spp.'ye ait *B.lincheniformis*, *B.pumilis* ve *B.subtilis*'in *B.cereus* gibi mezofilik sıcaklıklarda toksin üretebildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ayrıca *B.coagulans*'ın laktik asit üretimi nedeniyle süt ve süt ürünlerinin bozulmasına sıklıkla sebep olduğu bildirilmiştir.

Cleto ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada CIP uygulanmış süt üretim hatlarından izole edilen mikroorganizmalar moleküler olarak tanımlanmıştır. Çalışmada ağırlıklı olarak *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp. ve *Stenotrophomonas* spp. izole edilirken; hayvan yemlerinden kaynaklandığı belirtilen *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Ochromobacterium*, *Raoultella* ve *Rhodococcus* spp. de izole edilmiştir.

Abera ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise 329 koyun sütü incelenmiştir. Bu örneklerin %46,5'inde *Mannheimia haemolytica*, %39,3'ünde mastitis etmenlerinden olan *Pasteuriella multocida* ve %14,3'ünde ise *Bibersteina trehalosi* izole edilmiştir. Çalışmada bu izolatların tetrasiklin, eritromisin ve penisilin-G antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda bu tür bakterilerin üretim hatlarında görülmesi, çiğ süt kaynaklı bakterilerin pastörizasyon işlemi sonrası çapraz bulaş yolu ile üretim hattı yüzeylerine bulaştığının bir indikatörü olarak görülmüştür.

Ordella ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada İsviçre'de bulunan çiğ inek sütlerinden *Esherichia coli*, *Streptococcus* ve *Pasteuriella* spp. izole edildiğini ve bu izolatların penisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Cherif-Antar ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise süt işletmelerindeki çelik yüzeylerin mikrobiyal yükünü oluşturan mikroorganizmalar araştırılmıştır. *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*, *S.saprophyticus*, *S.epidermidis*, *S.aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia vulneris*, *Proteus mirabilis*, *Chrysobacterium* spp. ve *Streptomyces* spp. türünde mikroorganizmalar izole edilerek tanımlanmıştır. Hervet ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada süt ürünleri üretim hatlarından 3M Petri kullanılarak elde edilen izolatları *Acinetobacter*, *Breviundimonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* spp. ve *Enterobacteriaceae* olarak tanımlanmıştır.

Schön ve ark., (2016) drenajlardaki mikrobiyal florayı belirlemiştir. *Lactobacillus kefiranofaciens*'in laboratuvardaki drenajda tespit edildiğini bildirmiştir. Bu bakterinin ayrıca çiğ sütte de bulunduğu bildirilmiştir (Montel ve ark., 2014). *Streptococcus thermophilus*, *Pseudoalteromonas tetraodonis*, *Aeromonas punctata*, *Citrobacter freundii* laboratuvar drenajında, *Pseudomonas* spp. olgunlaştırma alanlarındaki drenajlarda rastlanmıştır. Ayrıca bu alanda *P. asplenii*, *P. oleovorans* ve *Arcobacter* spp. benzeri bakteriler de saptanmıştır. Mayalar açısından da *Debaryomyces hansenii* en çok belirlenen maya türü olurken, *Saccharomyces unisporus* spp. yüzey olgunlaştırma alanlarında bulunmuş *Torulopsis delbrueckii* bütün alanlarda, *Cryptococcus randhawai* ise laboratuvar drenajlarında bulunmuştur.

Çalışmamız boyunca üç farklı Ezine peyniri üreticisi firmanın üretim hattı yüzeylerinden ise *Listeria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobacterium*, *Sphingomonas*, *Mannheimia*, *Brevibacterium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Ochrobacterium*, *Pasteurella*, *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Geobacillus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* spp.'ye ait mikroorganizmalar izole edilmiştir.

#### **4.1.4.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyelleri**

##### **4.1.4.3.1. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Congo Red Agar Yöntemi İle Tespiti**

Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma kapasitesi öncelikle Congo Red Agar yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntemde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar özel bir besiyeri olan Congo Red agar üzerinde siyah koloniler ve yapışkan (slime) koloniler olarak gelişmektedir. Çalışma kapsamında izole edilerek tanımlanan tüm izolatlar Congo Red agar üzerine inoküle edilmiştir. (Congo Red Agar metodu kullanılarak biyofilm oluşturduğu belirlenen izolatlar için Bkz. Çizelge 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12.)

Tanımlanan *Listeria* türlerinden yalnızca drenajdan izole edilen *L.innocua* biyofilm pozitif kabul edilmiştir. Tanımlanan *Pseudomonas* türlerinden yine yalnızca biri çelik borudan izole edilen *P.stutzeri* biyofilm pozitif kabul edilirken; CFC agar ile salamura tanklarından izole edilen *Ochrobacterium anthropi* ve *Mannheimia haemolytica*'da biyofilm pozitif olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan *Enterobacteriaceae* türlerinden toplam 28 izolatının 21'inin *Enterobacteriaceae*'ya ait olduğu bulunmuştur. Bu izolatların 14'ü biyofilm pozitif olarak değerlendirilirken; biyofilm oluşturma potansiyeli olan izolatların 2'si *Klebsiella oxytoca*, 2'si *Aeromonas hydrophila*, 4'ü *Klebsiella pneumoniae*, 5'i

*Enterobacter cloacea*, 1'i *Enterobacter aerogenes* olarak tanımlanmıştır. İlgili mikroorganizmalar firmaların çiğ süt tankı, drenaj, duvar, personel eli ve maya maşrapası gibi yüzeylerinden izole edilmiştir. Toplam 32 adet izolatin ancak 7 tanesi ilgili yöntem ile biyofilm pozitif kabul edilmiştir. *Bacillus* spp. içerisinde biyofilm pozitif olarak değerlendirilen izolatların 1'i *Bacillus licheniformis*, 1'i *B.firmus*, 1'i *B.lentus* ve 4'ü ise *B.coagulans* olarak tanımlanmıştır. Plastik boru, salamura tankı, bıçak ve personel elinden izole edilen *Bacillus* spp.'lerin biyofilm pozitif olduğu değerlendirilmiştir.

Süt ve süt ürünleri endüstrisi için önemli patojen türleri bulunduran *Listeria* spp.'ın cam polipropilen ve plastik yüzeylere tutunabildiği ve plastik yüzeylerde dezenfektan maddelere karşı dirençli biyofilm ürettiği araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Herald ve Zottola, 1988; Mafu ve ark., 1990; Yıldırım 2013). Yıldırım (2013) tarafından yapılan çalışmada çiğ süt ve peynirden izole edilen *Listeria* spp'nin biyofilm oluşturma kapasitesi araştırılmıştır. Çalışmada incelenen 160 çiğ süt ve peynir örnekten 15 *Listeria* spp. izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların 11'i *Listeria innocua*, 3'ü *Listeria grayi* ve 1'i *Listeria welshimeri* olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada cam lameller ile yapılan tutunma miktarı ile ilgili araştırmada, bu izolatlardan 9'unun ilk 24 saat içerisinde yüksek derecede tutunma gösterdiği diğer izolatların ise 48. ve 72. saatlerde tutunma gösterdiği yani biyofilm oluşturma kapasitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise izole edilen, tanımlanan *Listeria* spp arasında Congo red agar yöntemi ile sadece 1 izolatin biyofilm oluşturma potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, Ankara çevresinden toplanan 50 çiğ süt örneğinden izole edilen 109 *Bacillus* izolatının 105'inin biyofilm oluşturabildiği tespit edilmiştir. Bu izolatların 11'i *Bacillus licheniformis*, 22'si *B.subtilis*, 14'ü *B.macerans*,4'ü, *B.Stearothermophilus*, 20'si *B.brevis*,1'i *B.pumilus*, 2'si *B.cereus*,1'i, *B.lentus*, 1'i *B.megaterium*, 5'i *B.polymyxa*, 6'sı *B.coagulans* ve 22'si diğer *Bacillus* türleri olarak adlandırılmıştır. Kristal viyole mikropilaka yöntemi kullanılarak 109 izolatin 105'i (%96,3) biyofilm pozitif, 4'ü (%3,7) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Teke Gündüz, 2012). Yapılan çalışma sırasında Congo Red agar yöntemi kullanıldığında *Bacillus* spp olarak tanımlanan izolatların yaklaşık % 26'sının biyofilm oluşturabileceği belirlenmiştir.

*Aeromonas* spp su kaynaklı bir bakteri olduğu için gıda işletim sistemlerinde ve su dağıtım sistemlerinde de kolonize olabilmektedir. Son çalışmalar iki farklı flageller sisteme sahip olan *Aeromonas*'ların, flagellalarının plastik yüzeylerde biyofilm oluşturmaya yardımcı olduğunu göstermiştir (Gavin ve ark., 2003). *Enterobacteriaceae* olarak izole edilen

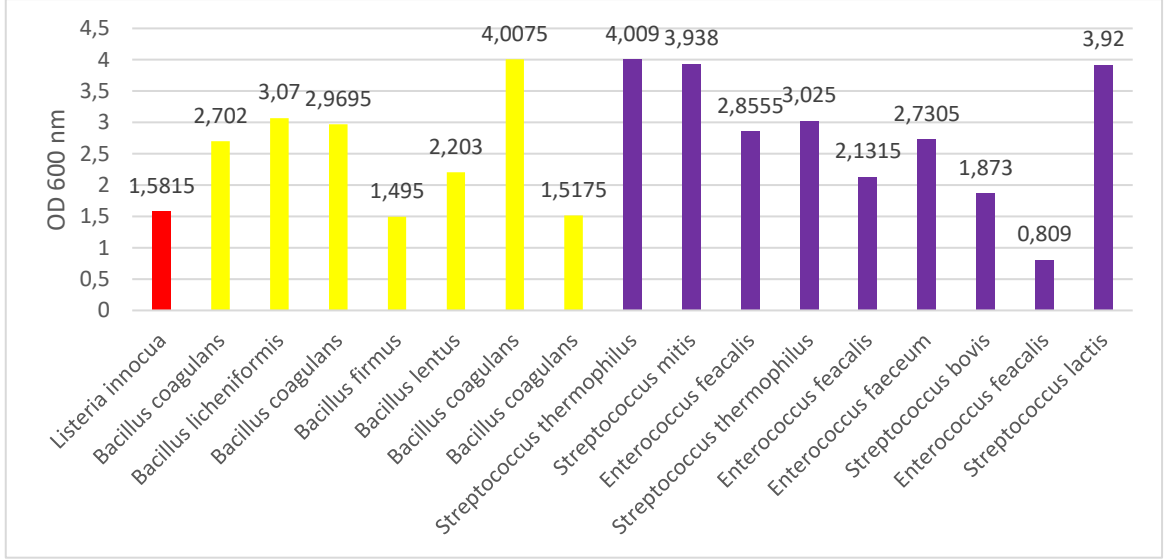


izolatların 2 tanesi *Aeromonas* spp olarak tanımlanmış iki izolattında biyofilm oluşturma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

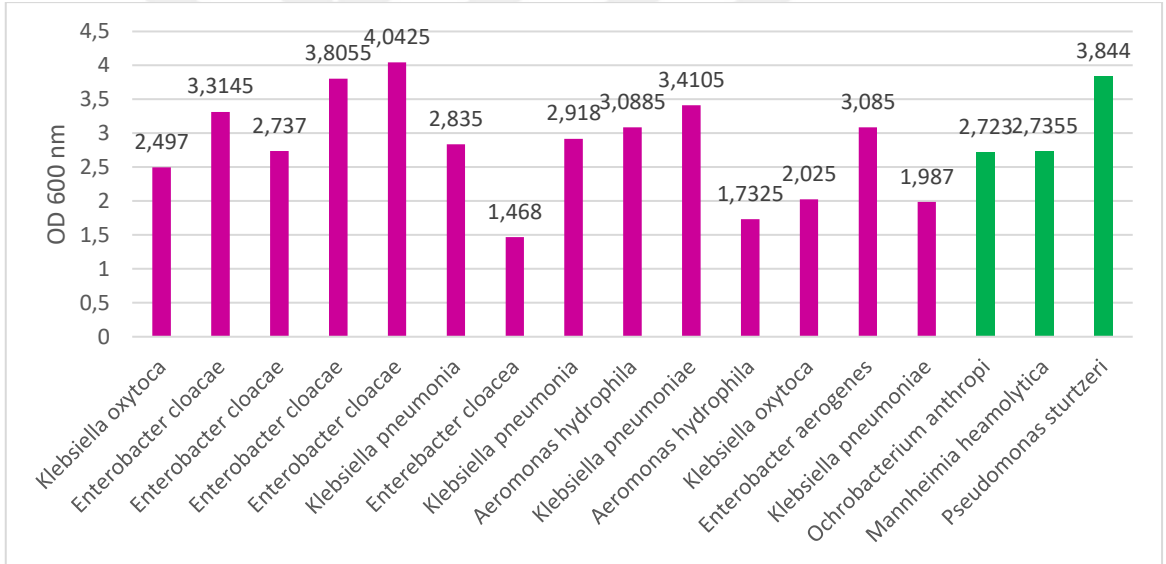
Benzer şekilde yüksek sıcaklıklarda gelişebilen ve süt teknolojisi açısından önemli bir bakteri olan *Streptococcus thermophilus*'un süt işletmelerinde ısı değiştiriciler üzerine tutunabildiği tespit edilmiştir (Andersson ve ark., 1995). Bizim çalışmamızda da *Streptococcus* spp ve *Enterococcus* spp yüzeylerden izole edilmiştir.

#### **4.1.4.3.2. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Kristal Viyole Mikroplaka Yöntemi İle Tespiti**

Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma kapasitesi, biyofilm oluşumunun tespiti için altın standart yöntem olarak kabul edilen kristalviyole mikroplaka yöntemi kullanılarak da incelenmiştir. Kristal viyole mikroplaka yöntemi; mikroorganizmaların mikroplaka kuyucuklarında geliştirilmesi, kuyucukların yıkanması ve bu işlem sonrası kuyucuklarda tutunmuş olarak kalan mikroorganizmaların optik densitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (O'Toole, 2011; Biswa and Doble, 2013; Lade et.al., 2014). Çalışmada başta Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatlar olmak üzere tüm izolatların biyofilm oluşturma durumu kristal viyole yöntemi ile incelenerek iki yöntem arasında bir karşılaştırma amaçlanmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda Congo Red Agar metodunun kristal viyole mikroplaka yöntemi yerine hızlı bir yöntem olarak kullanılabilirliği tespit edilmeye çalışılmıştır. Başlangıç aşamasında Congo Red Agar yöntemi ile biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların biyofilm oluşturma durumunun kristalviyole mikroplaka yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3'de görülebilir. Bir sonraki aşamada ise Congo Red Agar yöntemi ile biyofilm oluşturmadığı tespit edilen izolatların biyofilm oluşturma durumu kristal viyole mikroplate yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.2. Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturduğu belirlenen Gram pozitif izolatların kristal viyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi



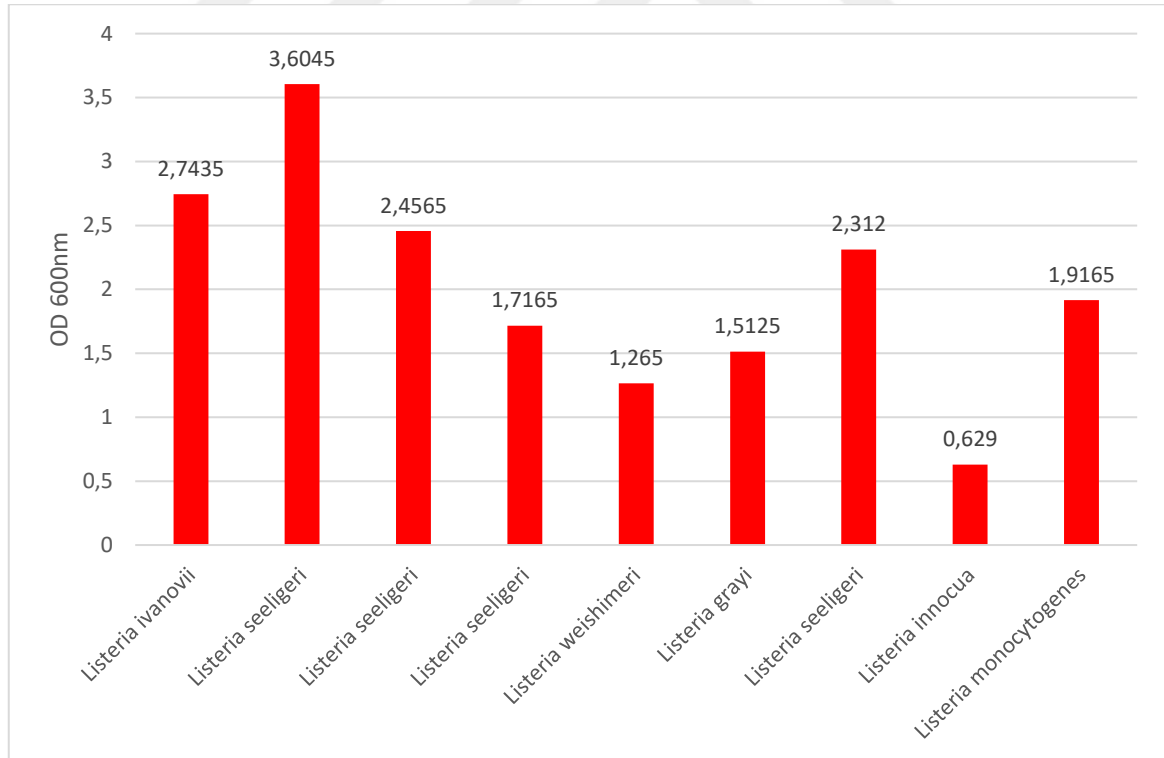
Şekil 4.3. Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturduğu belirlenen Gram negatif izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi

Sepanovic ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada herhangi bir kuyucuktan elde edilen OD değerinin, kontrol kuyucuğundan ( $OD_{kontrol}$ ) elde edilen değer ile eşit veya az ise mikroorganizmanın biyofilm oluşturmadığı şeklinde değerlendirme yapıldığı bildirilmiştir. Magesh ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise  $OD < 0,120$  olması durumunda mikroorganizma biyofilm oluşturmayan veya zayıf seviyede biyofilm oluşturan, OD değeri  $0,120 < OD < 0,240$  arasında ise orta seviyede biyofilm oluşturan ve  $0,240 < OD$  ise güçlü seviyede biyofilm oluşturan olarak değerlendirilmektedir. Cruz ve Fletcher (2011) tarafından yapılan

çalışmada ise OD değerleri 0,0-0,7 arasında ise mikroorganizma zayıf biyofilm oluşturabilen, 0,7-1,1 arasında ise orta seviyede biyofilm oluşturabilen ve 1,1'den fazla ise güçlü seviyede biyofilm oluşturabilen olarak tanımlanmaktadır.

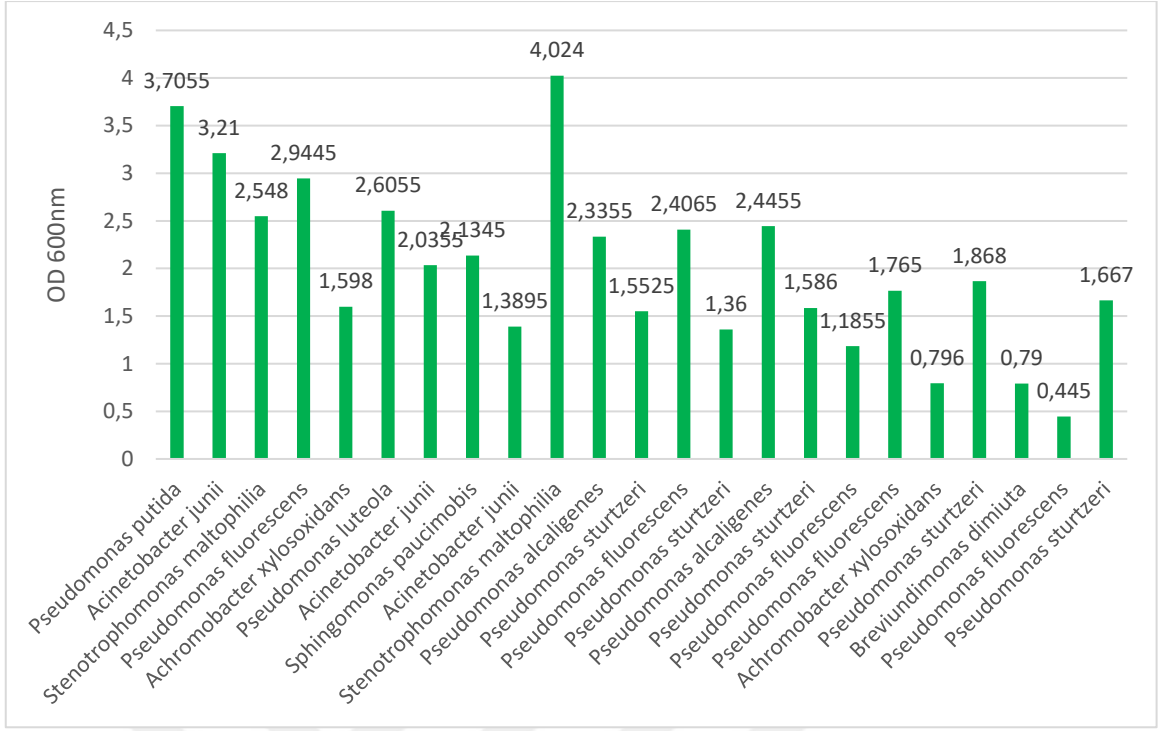
Çalışmamızda kontrol kuyucuğunun OD değeri 0,204'dür. Sepanovic ve ark. (2000) tarafından kullanılan skala kullanılmıştır. Bu durumda OD değeri 0,204'a eşit veya az ise biyofilm negatif,  $0,204 < OD \leq 0,408$  zayıf,  $0,408 < OD \leq 0,816$  orta ve  $0,816 < OD$  ise güçlü seviyede biyofilm oluşturan mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. Congo red agar metodu ile biyofilm pozitif olan izolatların OD değerlerinin değerlendirildiği çalışma incelendiğinde hemen tüm izolatların güçlü biyofilm oluşturuca mikroorganizmalar olduğu belirlenmiştir. Sadece 26 nolu üretim personelinden izole edilen *Enterococcus faecalis* orta seviyede bir biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir.

Congo Red agar metodu ile siyah pigment oluşturmaması nedeniyle biyofilm negatif olarak değerlendirilen izolatların tümü kristalviyole mikropilaka yöntemi incelenen izolatların da güçlü biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7).

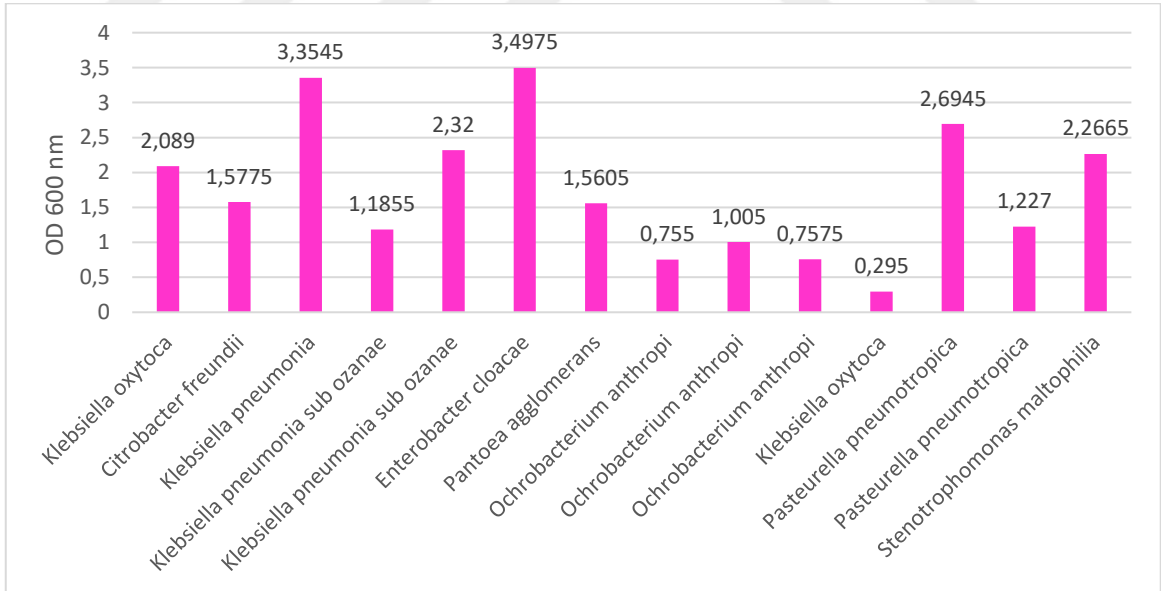


Şekil 4.4. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen *Listeria* spp.'lerin kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi

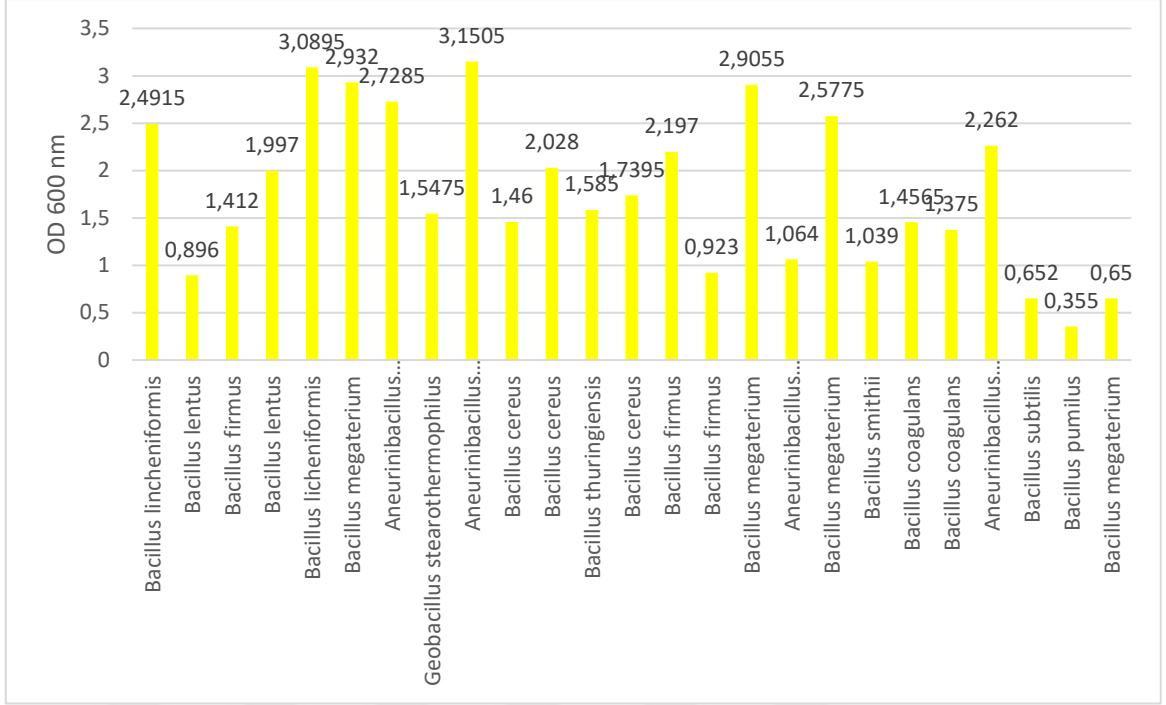
Congo Red Agar metodu ile biyofilm oluşturmadiğı değerlendirilen izolatların incelendiği çalışmada ise cendere bezinden elde edilen *Listeria innocua*; bıçak ve teleme kırma bıçağından elde edilen *Ochrobacterium anthropi*; plastik boru ve drenajdan izole edilmiş *Achromobacter xylosoxidans* ve *Breviundimonas dimiuta*; biri duvar diğeri bıçaktan izole edilmiş *Bacillus subtilis* ve *B. megaterium* orta seviyede biyofilm oluşturan mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. Üretim personelinden izole edilen *Klebsiella oxytoca*, salamura teknesinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* ve drenajdan izole edilen *Bacillus pumilus* ise zayıf zeyiyede biyofilm oluşturan mikroorganizma olarak değerlendirilirken; diğerler tüm izolatlar güclü biyofilm oluşturan mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen son sonuçlara göre sadece cendere bezinden izole edilen *Listeria innocua* orta seviyede; diğer *Listeria spp.*'ler drenajdan izole edilen *Listeria monocytogenes* de dahil olmak üzere güclü biyofilm üreticileri olarak değerlendirilmiştir. Bu durum ciddi bir soruna işaret etmektedir. Yine *Enterobacteriaceae*'e ait, su ve üretim personelinden izole edilen, insan sağlığı için tehlike oluşturabilen *Klebsiella pneumonia* ve *Klebsiella pneumonia sub ozanae*'nın da güclü biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas spp.*'den soğukta gelişebilen ve hidrolitik enzim üreten *Pseudomonas fluorescens*'in drenajda orta ve salamurada güclü seviyede biyofilm oluşturması son ürün kalitesi için oldukça önemli bir sonuçtur. *Bacillus spp.*'lerden olan su ve drenajdan izole edilerek tanımlanan *B.cereus*'un enteroroksin oluşturabildiği bilinmektedir. Akan ve ark. (2011) tarafından belirtildiği üzere soğukta da gelişebilen ve ısıyada dirençli olan bu mikroorganizmalar son ürün kalitesi ve insan sağlığı açısınan önemli soru işaretleri oluşturmaktadır.



Şekil 4.5. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen CFC Agar kullanılarak izole edilmiş izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi



Şekil 4.6. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen VRBGA Agar kullanılarak izole edilen izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi



Şekil 4.7. Congo Red Agar Metodu ile biyofilm oluşturmadığı belirlenen Hicrome *Bacillus* Agar kullanılarak izole edilen izolatların kristalviyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm oluşum kapasitesi

Çalışmamızda Congo Red Agar metodu kullanımı mikroorganizmaların biyofilm oluşturma durumlarını belirlemek için yeterli görülmemiştir. Saising ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada aknelerden izole edilen *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma kapasitesi her iki yöntem ile de araştırılmıştır. Koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma kapasitesi mikropilaka yöntemi ile %68,8 olarak bulunurken Congo Red Agar metodu ile %62,5 olarak bulunmuştur. Koagülaz negatif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma kapasitesi mikropilaka yöntemi ile %97,7 olarak bulunurken Congo Red Agar metodu ile %84,7 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar Congo Red Agar metodunun biyofilm üretiminin tespiti için hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Darwish ve Asfour (2013) tarafından yapılan çalışmada ise mastitis sebebi olan 40 koagülaz pozitif, 68 koagülaz negatif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma kapasitesi her iki yöntem ile belirlenmiştir. 40 adet koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma kapasitesi Congo Red agar metodu kullanılarak sıra ile %32,5 güçlü, %35 orta seviyede biyofilm üreticisi ve %32,5'in biyofilm üretmediği belirlenirken; mikropilaka yöntemi ile %52,5'i güçlü, %27,5'si orta ve %20'si zayıf oranda biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. 68 adet koagülaz negatif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm

oluşturma kapasitesi ise Congo Red agar metodu kullanılarak sıra ile %29,5'i güçlü, %42,6'sı orta seviyede biyofilm üreticisi ve %27,9'in ise biyofilm üretmeyen olarak belirlenirken; mikropilaka yöntemi ile %44'ü güçlü, %30,9'si orta ve %19,2'si zayıf seviyede biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sırasında biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilen *eno*, *icaA*, *icaD* ve *bap* genleri de araştırılmıştır. Koagülaz pozitif olan mikroorganizmalarda genler sırası ile %75, %15, %62,5 ve %2,5 oranında tespit edilebilirken; koagülaz negatif olan mikroorganizmalarda %92,6, %5,9, %47,1 ve %4,4 oranlarında belirlenmiştir. Araştırmacılar Congo Red agar metodu ile kristalviyole mikropilaka yönteminin tam olarak birbirini karşılamadığını belirtirken; genler ile biyofilm oluşumunun da tam olarak açıklanamadığına da dikkat çekmişlerdir.

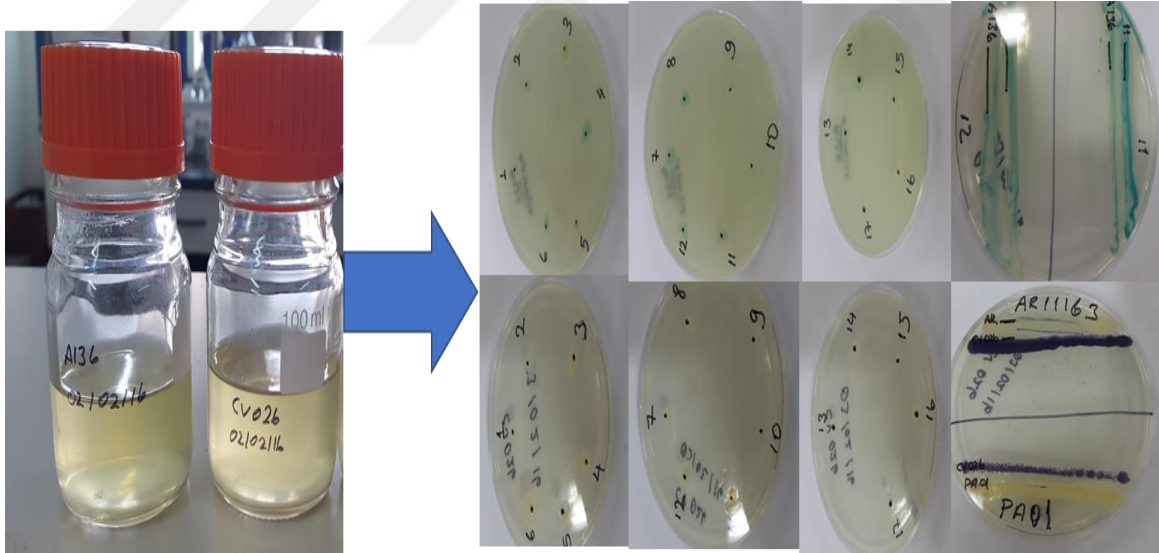
Yapılan çalışmada Congo Red agar metodu kullanılarak üretim hatlarından izole edilen ve API kitleri ile tanımlanan *Listeria* spp. izolatların %10'u biyofilm üretici olarak tanımlanırken; kristal viyole mikropilaka yöntemiyle izolatların tamamının biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Muhtemel *Pseudomonas* spp olarak tanımlanan izolatların %11,54'ü biyofilm üretici olarak tanımlanırken; kristal viyole mikropilaka yöntemiyle izolatların 1'i zayıf, 2'si orta seviyede diğerleri güçlü seviyede biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Muhtemel *Enterobacteriaceae* olarak tanımlanan izolatların %42,86'sı biyofilm üretici olarak tanımlanırken; kristal viyole mikropilaka yöntemiyle izolatların 1'i zayıf, 2'si orta seviyede diğerleri güçlü seviyede biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Muhtemel *Streptococcus* spp. olarak tanımlanan izolatların %100'sü biyofilm üretici olarak tanımlanırken; kristal viyole mikropilaka yöntemiyle izolatların 1'si orta seviyede diğerleri güçlü seviyede biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Muhtemel *Bacillus* spp. olarak tanımlanan izolatların %21,88'sü biyofilm üretici olarak tanımlanırken; kristal viyole mikropilaka yöntemiyle izolatların 1'i zayıf, 2'si orta seviyede diğerleri güçlü seviyede biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda Congo Red agar metodu ile biyofilm üreticisi olmadığı belirlenen tüm izolatların; Congo Red agar metodu ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Yine Congo Red agar metodu ile biyofilm üreticisi olarak tanımlanan tüm izolatlar kristal viyole mikropilaka yöntemi ile yine biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Bu durum nedeniyle Congo Red agar metodunun biyofilm oluşturan mikroorganizmaların tespiti için yeterli bir yöntem olarak görülmemesi gerektiği kanısına varılmıştır.

#### 4.1.3.3. İzolatların Quorum Sensing Sinyallerinin Varlığının Araştırılması (AHL, AI-2)

Çalışmamızda biyofilm oluşumuna ve direnç gelişimine katkısı olduğu düşünülen, mikroorganizmaların birbiri ile haberleşmesini sağlayan kimyasal konuşma sistemi sinyallerinin varlığı da araştırılmıştır. Peynir üretim hatlarından izole edilen Gram negatif (*Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp.) ve Gram pozitif (*Listeria* spp., *Streptococcus* spp. ve *Bacillus* spp.) bakterilerin quorum sensing(QS) sinyallerinin varlığı incelenmiştir. Gram negatif bakterilerin konuşma sinyali olan N-Acyl homoserine lactone (AHL) ile Gram pozitif bakterilerinde konuşma sinyali olan Auto inducer-2 (AI-2) varlıkları araştırılmıştır.

##### 4.1.3.3.1. Gram Negatif İzolatların AHL Sinyallerinin Varlığının Araştırılması

Gram negatif bakterilerin QS sinyali olan AHL'lerden olan kısa zincirli AHL sinyalleri (C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL ve 3-oxo-C4~C8) *Chromobacterium violaceum* CV026 indikatörlüğünde tespit edilmiştir. Orta ve uzun zincirli AHL sinyalleri (C8-HSL, 3-oxo-C8HSL, C10-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL ve C14-HSL) *Agrobacterium tumefaciens* A136 indikatörlüğünde  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi ile tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Gram negatif bakterilerde AHL sinyal varlığının tespiti

Çalışmamız sırasında tüm Gram negatif izolatların kısa ve uzun sinyal varlıkları incelenmiştir. *Chromobacterium violaceum* CV026 indikatörlüğünde Luria Bentani agara nokta ekim yapılan izolatlardan hiçbiri mor pigment vermemiştir. Bu neden ile izolatlarımızın kısa zincirli AHL oluşturmadığı tespit edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens*

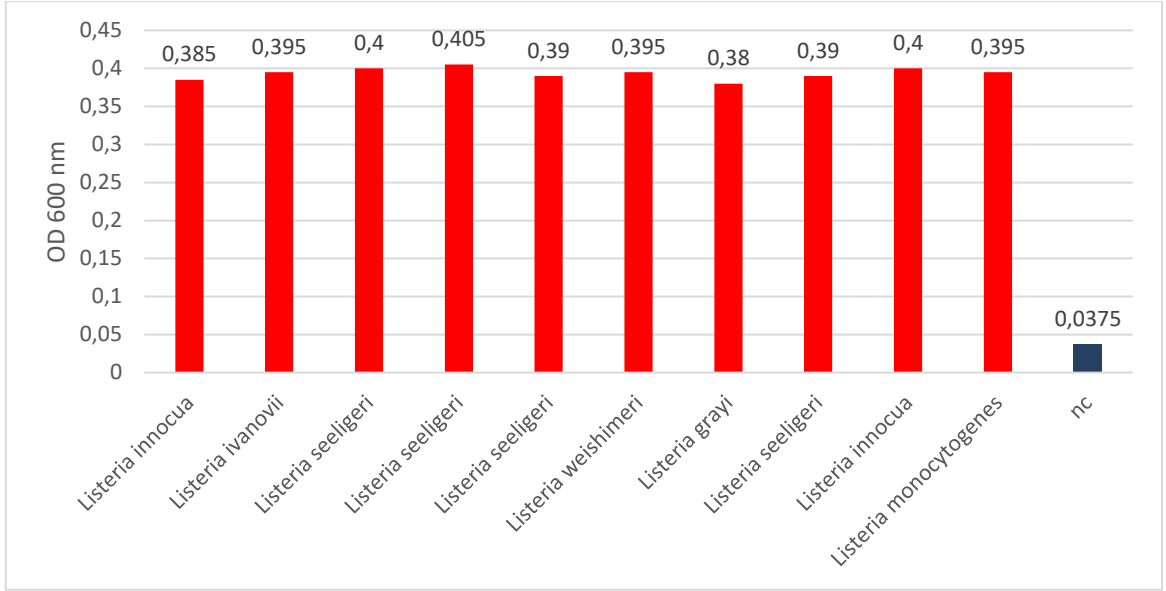


A136 indikatörlüğünde nokta ekim yapılan Gram negatif izolatların büyük çoğunluğu mavi-yeşil pigment vermiştir. Bununla birlikte *Enterobacteriaceae* ait izolatlardan olan ve maya maşrapasından izole edilen biyofilm pozitif *Aeromonas hydrophila*'nın mavi-yeşil pigment oluşturmadığı tespit edilmiştir. *Aeromonas hydrophila*'nın Congo Red Agar ve kristal viyole mikropilaka yöntemi ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. CFC agardan izole edilen ve Congo Red Agar ile biyofilm pozitif olduğu belirlenen izolatların da hiçbirinin mavi-yeşil pigment oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu izolatlar çelik borudan izole edilen *Pseudomonas stutzeri*, salamura teknelerinden izole edilen *Ochrobacterium anthropi* ve *Mannheimia haemolytica*'dır. Bu durum nedeniyle bakterilerin indikatörlüğünde tespit edilemeyecek daha uzun zincirli sinyallerin varlığına işaret ettiği değerlendirilmesi yapılmıştır.

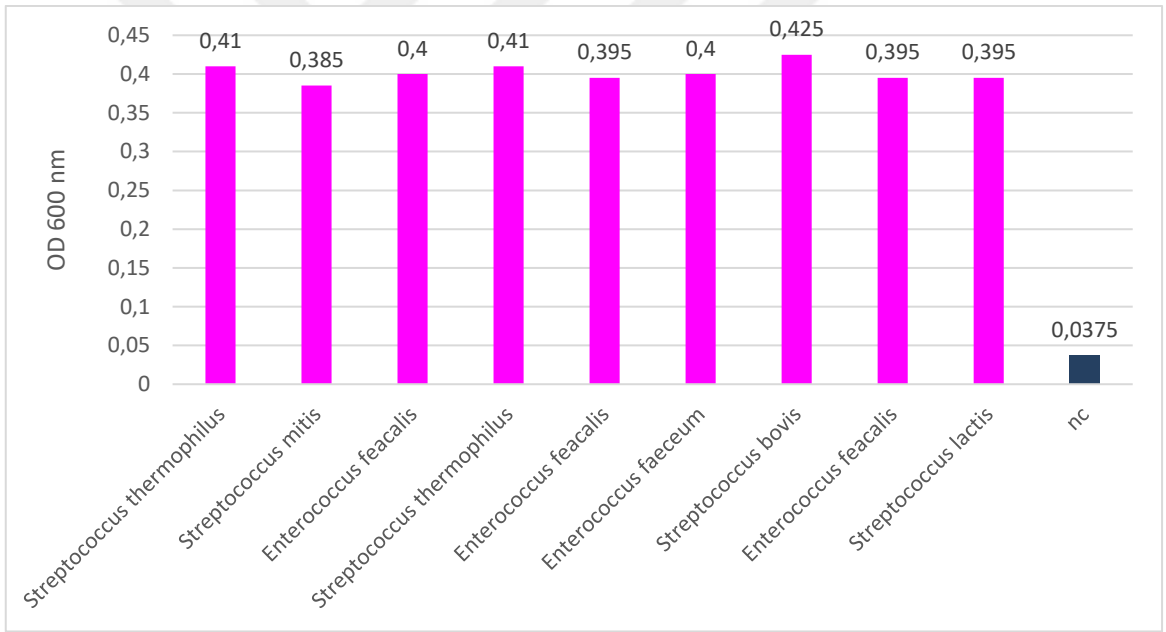
Lade ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada biyoreaktörlerden izole edilen ve biyofilm özellikleri tespit edilmiş Gram negatif *Pseudomonas* ve *Aeromonas* spp.'ye ait izolatların kısa, orta ve uzun AHL sinyal varlıkları incelenmiştir. Toplam 200 izolatın 168'inin AHL üretmediği tespit edilirken; 32 izolatın kısa ve orta AHL ürettiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar da çalışmamıza benzer olarak elde ettikleri *Aeromonas hydrophila*'nın kısa zincirli AHL üretmediğini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada *Pseudomonas japonica* izole edilmiş; izolatın kısa AHL üretmediği belirlenmiştir. Tang ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* spp.'ye ait izolatlarda sadece orta ve uzun zincirli AHL sinyallerini tespit edebildikleri bildirilmiştir.

#### **4.1.3.3.2. Gram Pozitif İzolatların AI-2 sinyallerinin Varlığının Araştırılması**

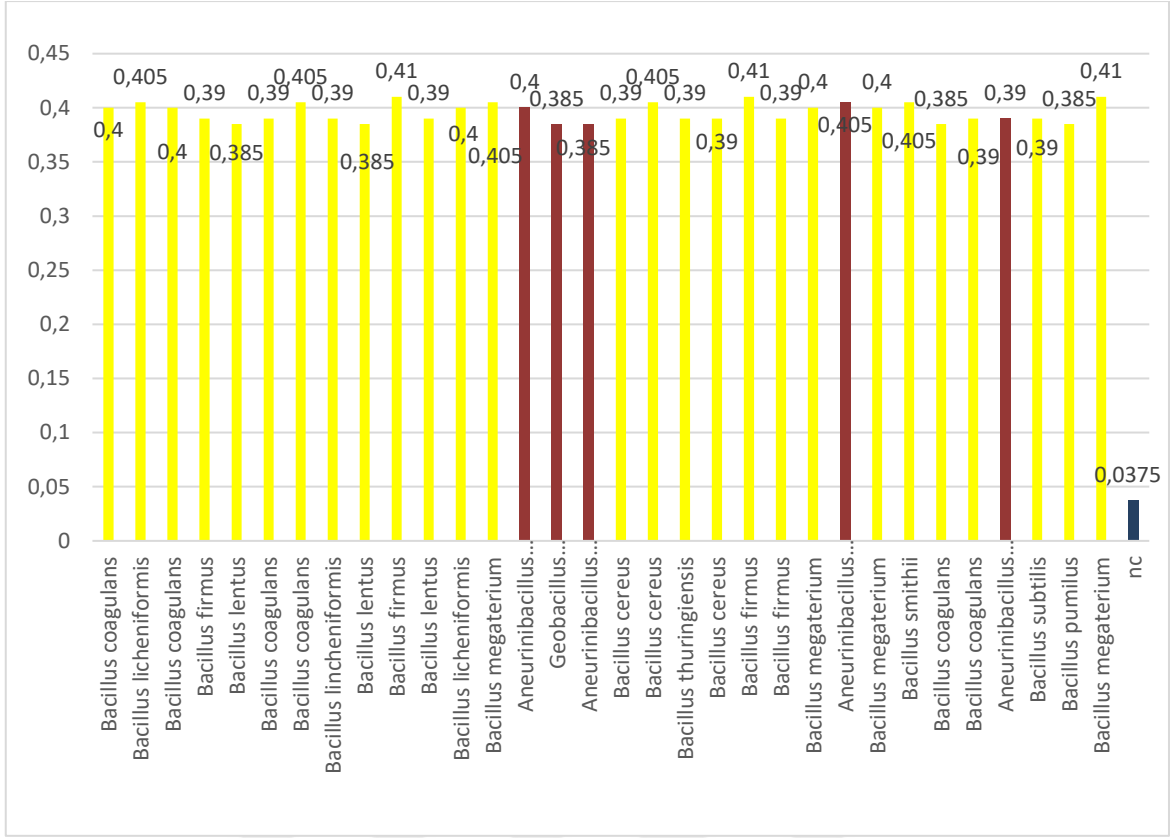
Çalışmamızda Ezine peynir üretim hatları elde edilen Gram pozitif izolatların biyofilm oluşumu ve direnç gelişimi için önemli bir faktör olan quorum sensing sinyal varlıkları araştırılmıştır. Gram pozitif (*Listeria* spp., *Streptococcus* spp. ve *Bacillus* spp.) bakterilerin de kullandığı bir sinyal sistemi olan AI-2 sinyal varlıkları *Vibrio harveyi* BB 170 indikatörlüğünde incelenmiştir (Şekil 4.9, 4.10, 4.11). Çalışmada AI-2 sinyal varlığının incelemesi için Congo Red agar metodu ile biyofilm pozitif olduğu belirlenen izolatlar yanı sıra kristal viyole mikropilaka yöntemi ile güçlü biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen izolatlar kullanılmıştır.



Şekil 4.9. *Listeria* spp. AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol)



Şekil 4.10. *Streptococcus* spp. AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol)



Şekil 4.11. Hicrome *Bacillus* Agar kullanılarak izole edilmiş izolatların AI-2 sinyal varlığının belirlenmesi (nc: negatif kontrol)

Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10’da nc olarak ifade edilen birim negatif kontrol kuyucuğudur ve içinde sadece indikatör mikroorganizma olan AB besiyeri içerisinde *Vibrio harveyi* BB 170 bulunmaktadır. Yöntemin temelinde indikatör mikroorganizmanın ortamda AI-2 sinyali varlığında ışımaya yapması vardır. *Vibrio harveyi* BB 170 AI-2 sinyali varlığında ışımaya yapan bir mikroorganizmadır (Bassler, 2002; Waters and Bassler, 2007; Park ve ark., 2014). Çalışmada AI-2 sinyali varlığı negatif kontrole (nc) oranla tespit edilmiştir. Vilchez ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada yöntemde negatif kontrol olarak kullanılan *V.harveyi* MM 30 yerine *Vibrio harveyi* BB 170 içeren AB besiyeri kullanımı arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bildirilmiştir ( $P < 0,05$ ). Turovskiy ve Chinkidas (2006) tarafından yapılan çalışmada 600 nm’de pozitif kontrol olarak kullanılan *Vibrio harveyi* BB 120’nin OD değeri 1,0 olarak bulunurken; negatif kontrol (nc) olarak kullanılan *V.harveyi* MM 30’in OD değeri 0,0 olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8’de görüldüğü üzere negative kontrol olarak kullanılan içinde *V.harveyi* BB 170 içeren AB besiyerinin OD değeri 0,0375 olarak okunmuştur. Bu duruma AB besiyerinde bulunan ve AI-2 sinyal molekülü gibi davranan bazı maddelerin sebep olmuş olabileceği değerlendirilmektedir (Vilchez ve

ark., 2007). Okunan değerin dk olmasından dolayı *V.harveyi* BB 170 içeren AB besiyerinin negatif kontrol olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11’de görüldüğü üzere tüm Gram pozitif izolatların OD değeri nc değerinden yüksektir. Bu nedenle belirlenmiş tüm izolatlar AI-2 sinyali üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada belirlendiği üzere en yüksek OD değeri veren *Streptococcus bovis* cendere bezinden izole edilmiştir. İkinici en yüksek değeri veren *Aneurinibacillus aneurinilyticus* sudan, *Streptococcus thermophilus* elik borudan, *Enterococcus faecalis* duvardan izole edilmiştir. *Listeria* spp.’e ait en yüksek değerin elik borudan izole edilen *Listeria innocua*’a ait olduğu belirlenmiştir.

Vilchez ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada mikroplate okuyucular (600 nm) ve Biyoluminesans okuyucular ile elde edilen sonuçlar incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak *Vibrio harveyi* BB 152 kullanılan çalışmada, mikroorganizma 0,75-3,75 saat 30°C’de inkübe edilmiş ve AI-2 aktivitesi incelenmiştir. 600 nm’de AI-2 aktivitesi değerleri 0,831-0,121 değeri arasında tespit edilmiştir. RLU değerleri ise 6,1-5,8 değerleri arasında bulunmuştur. Araştırmacılar 600 nm’de okunan optik yoğunluk değeri ile Biyoluminesans değerinin (RLU) okunduğu yöntemin benzerlik taşıdığını belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada atık arıtma tesislerinden izole edilen R1 ve R2 izolatlarının toplam 35 gün boyunca AI-2 aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada AI-2 aktivitesi negatif kontrole karşı izolatlardan elde edilen OD değerleri ile arıtma tesisinden elde edilen amurun Gramında AI-2 aktivitesi olarak hesaplanmıştır. Çalışma başlangıcında AI-2 aktivitesi/g izolatlar için 0,83-2,33 değerlerinde hesaplanmıştır. Çalışmada AI-2 aktivitesi 14. günde en yüksek değerine ulaşmış (8,33), 35. günde bu değerler 1,8-2,55 seviyelerine geri dnmştir. Blana ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada marketlerde satılan kıymalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (*Leuconostoc* spp., *Weisseria* spp. ve *Lactococcus* spp.) AI-2 aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada Gram pozitif laktik asit bakterilerin AI-2 sinyal aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmada da bir laktik asit bakterisi olan *S.thermophilus*’un AI-2 aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Almasoud ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Esherichia coli* ve *Salmonella* spp. ait mikroorganizmaların AI-2 aktivitesi luminometre kullanılarak araştırılmış; değerler 55 ve 53 RLU olarak bulunmuştur. Araştırmacılar mikroorganizmaların AI-2 aktivitesinin oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Jones ve Blasser (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus anthracis* ve *B.subtilis* gibi *Bacillus* türlerinde AI-2 sinyali oluşumunu sağlayan genlerin tespit edildiğinden bahsedilmiştir.

## 4.2. Peynir Üretim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Pozitif İzolatları Üzerine Etkili Antimikrobiyal ve Antiquorum Sensing Doğal Maddelerin Belirlenmesi

Doğal, antibiyofilm ve antiquorum sensing dezenfektan madde üretiminin ana aşaması olarak çeşitli doğal maddelerin belirlenmesi amacıyla; maddelerin antimikrobiyal ve quorumquenching etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Doğal madde olarak Epigallocatechin gallate, *Panax ginseng*, curcumin, *Camellia sinensis*, vanilin, kırmızı *panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Prunella vulgaris*, *Sambucus nigra*, *Cichorium intybus*, *Calendula officinalis*, boraks, propolis, resveratrol, elma sirkesi, nisin, *Hypericum perforatum* ve *Thymus vulgaris* kullanılmıştır. Bu maddelerin seçiminde doğal oluşu, kolay elde edilebilirliği ve literatürde antimikrobiyal etkisi ile karşılaştırılması etkili olmuştur. Boraks maddesi hariç tüm maddelerin 1 mg/mL'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Boraks maddesi ise ülkemiz için oldukça önemli bir madde olup; dünya rezervinin yaklaşık %61'ı ülkemizde bulunmaktadır. İkinci büyük rezerv ise Amerika Birleşmiş Devletleri'nde olup; iki ülke ise dünya rezervinin %90'nını elinde bulundurmaktadır (Türker ve ark., 2014; Erkmen ve Yapıcı, 2015). Bu madde 1 mg/mL ve 2 mg/mL konsantrasyon seviyelerinde hazırlanmıştır. Ekstraktlar gıda sanayinde dezenfektan olarak kullanılan ve dezenfektanların hazırlanmasında kullanılan %70'lik etil alkol ile hazırlanmıştır.

### 4.2.1. Doğal Ekstraktların Antimikrobiyal-Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma sırasında öncelikle ilgili maddelerin Congo Red Agar ve kristal viyole mikropilaka metot ile biyofilm pozitif izolatlar, dezenfektan dirençli kontrol suşları üzerine antimikrobiyal-antibiyofilm özellikleri incelenmiştir. Çalışmada bu maddelerin etkileri disk difüzyon metodu (Kirby-Bauer) ile araştırılmış; incelenen maddelerin antibiyofilm-antimikrobiyal etkisi Çizelge 4.14'de verilmiştir.

*Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, vanilin, curcumin, kırmızı *panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Prunella vulgaris* ve *Sambucus nigra* maddelerinden herhangi bir zon elde edilememiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan su ve %70'lik etil alkol maddelerinden herhangi bir zon elde edilememiştir.

Çizelge 4.14. Doğal maddelerin antimikrobiyal madde analizlerinde zon çapları sonuçları

| <b>Kültür</b>                     | <b><i>Calendula officinalis</i></b> | <b>Boraks 1<br/>(1mg/ml)</b>       | <b>Propolis1</b>              | <b>Boraks 2<br/>(2mg/ml)</b> | <b>Propolis2<br/>(Ticari)</b>   | <b>Resveratrol</b>  |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>L.innocua</i> (1)              | 9±0,0                               | 12±1                               | 9±0,0                         | 9±0,0                        | 10±0,0                          | 10±0,0              |
| <i>E.cloacea</i> (6)              | 8±0,0                               | 9±0,0                              | 8±0,0                         | 8,5±0,5                      | 8±0,0                           | 7,5±0,5             |
| <i>P.stutzeri</i> (18)            | 9±0,0                               | 8±0,0                              | 9±0,0                         | 7,5±0,5                      | < 6                             | < 6                 |
| <i>S.lactis</i> (27)              | 7±0,0                               | 9±0,0                              | 9±0,0                         | 7,5±0,5                      | 9±1,0                           | 7,5±0,5             |
| <i>B.coagulans</i> (32)           | 8±0,0                               | 8±0,0                              | 8±0,0                         | 9,5±0,5                      | 8±0,0                           | < 6                 |
| <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 10±0,0                              | 8±0,0                              | 7,5±0,5                       | 8±0,0                        | 8±0,0                           | < 6                 |
| <i>S.aureus</i> ATCC<br>6538 P    | 9±0,0                               | 8±0,0                              | 10±0,0                        | 8±0,0                        | 15±1                            | 9±0,0               |
| <i>M.luteus</i> ATCC<br>4698      | 9±0,0                               | 8±0,0                              | 8±0,0                         | 8±0,0                        | 10±0,0                          | 8±0,0               |
| <i>E.coli</i> ATCC<br>25922       | 9±0,0                               | 10±0,0                             | 8,5±0,5                       | 9±0,5                        | < 6                             | < 6                 |
| <b>Kültür</b>                     | <b>Nisin</b>                        | <b><i>Hypericum Perforatum</i></b> | <b><i>Thymus vulgaris</i></b> | <b>EGCG</b>                  | <b><i>Cichorium intybus</i></b> | <b>Elma Sirkesi</b> |
| <i>L.innocua</i> (1)              | 9,5±0,5                             | 8,5±0,5                            | 7±0,0                         | 18,5±0,5                     | < 6                             | 7,5±0,5             |
| <i>E.cloacea</i> (6)              | 7±0,0                               | 7±0,0                              | 8,5±0,5                       | 16±1                         | < 6                             | < 6                 |
| <i>P.stutzeri</i> (18)            | 7±0,0                               | 8±0,0                              | < 6                           | 17±0,0                       | < 6                             | 7±0,0               |
| <i>S.lactis</i> (27)              | 10±0,0                              | 9±0,0                              | 8,5±0,5                       | 18±1                         | < 6                             | < 6                 |
| <i>B.coagulans</i> (32)           | 7,5±0,5                             | 8±1,0                              | 7±0,0                         | 18±0,0                       | < 6                             | < 6                 |
| <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 7±0,0                               | 7,5±0,5                            | 7±0,0                         | 15±0,0                       | 7±0,0                           | < 6                 |
| <i>S.aureus</i> ATCC<br>6538 P    | 9±1,0                               | 10±0,0                             | 10±0,0                        | 17,5±0,5                     | 8±0,0                           | < 6                 |
| <i>M.luteus</i> ATCC<br>4698      | 8±0,0                               | 7±0,0                              | 7±0,0                         | 13,5±0,5                     | < 6                             | 8±0,0               |
| <i>E.coli</i> ATCC<br>25922       | 7±0,0                               | 7±0,0                              | < 6                           | 18,5±0,5                     | 8±0,0                           | < 6                 |

\*Ortalama±Sandart Sapma, mm

Çizelge 4.14'de görüldüğü üzere Epigallocatechin gallate (EGCG), *Calendula officinalis*, boraks 1, boraks 2, propolis 1, nisin ve *Hypericum perforatum* tüm mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal-antibiyofilm etkili olduğu tespit edilmiştir. Propolis 2, 18 nolu izolat *Pseudomonas stutzeri* ve *Esherichia coli* ATCC 25922 üzerine etkili olmadığı tespit edildiği gibi ekstraktın son derece yapışkan ve yüzeyi boyar olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenlerle propolis 2 olarak adlandırılan ticari popolis ekstraktı ile çalışılmaya devam edilmemiştir.

Çalışmamızda güçlü biyofilm oluşturan ve dezenfektan dirençli mikroorganizmalar üzerine en etkili madde epigallocatechin gallate olduğu belirlenmiş; ikinci en etkili maddenin ise boraks 1 olduğu görülmüştür.

Laird ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada bergamot ve portakal esansiyel yağının 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen doğal maddenin hastanelerden izole edilen vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'un biyofilm oluşumunun üzerine etkisi incelenmiştir. Kristal viyole mikropilaka yöntemi kullanılarak maddelerin *E.feacalis*'in biyofilm oluşumunu %76 oranında, *S.aureus*'un biofilm oluşumunu %48 oranında azaldığı tespit edilmiştir. DeOliveira ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada ise limon otu esansiyel yağının *Listeria monocitogenes*'in biyofilm oluşumunu %40 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Özcan ve Zorba (2016) tarafından yapılan çalışmada ise tarçın esansiyel yağı, limon esansiyel yağı ve ultrases ile kombinasyonlarının *Listeria monocitogenes* üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar limon esansiyel yağının *Listeria monocitogenes* üzerine inhibisyon zonu çapının 13,67 mm olarak tespit ederken; tarçın esansiyel yağının inhibisyon zonu çapının 21 mm olduğu belirlemişlerdir. Araştırmacılar tarafından tespit edilen inhibisyon zon çapları çalışmada elde edilen değerlerden oldukça fazladır. Bununla birlikte tarçın esansiyel yağı dışında diğer esansiyel yağların asidik yapıda oluşu gıda üretim hatlarında korozyon sebebi olabileceğinden, bu tür esansiyel yağlar tercih edilmemiştir. Yine yağlı yapının yüzeylerden uzaklaştırılmasının zor olacağı çalışma başlangıcında düşünüldüğünden esansiyel yağlar ile çalışılmaması kararı verilmiştir.

Lade ve ark. (2015) yapılan çalışmada curcumin ve epigallocatechin gallate (EGCG)'ın DMSO ile hazırlanan ekstraktlarının arıtma sistemlerinden elde edilen biyofilm oluşturabilen Gram negatif bakteriler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ilgili maddelerin yarı MİK değerlerinin mikroorganizmaların biyofilm üretime üzerine %52-78 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir. Serra ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise EGCG'nin csgD mRNA ve sRNA RybB'yi baskılayarak biyofilm üretimini engellediğini

belirlemişlerdir. Çalışmamızda da EGCG'nin inhibisyon zonu çaplarının diğer doğal madde ekstraktlarına oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bayoub ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada 13 adet bitkinin %90'lık etil alkol ile hazırlanan ekstraktlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 üzerine antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada tetrasiklin antibiyotiğinin *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 üzerinde inhibisyon zonu 33 mm, vankomisin antibiyotiğinin ise inhibisyon zonu çapı 20 mm olarak ölçülmüştür. %90 etil alkolle hazırlanan nane ekstraktının inhibisyon zonu 26 mm, mine çiçeği ekstraktının ise inhibisyon zonu 14 mm olarak tespit edilmiştir. Bayoub ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 üzerine *Thymus vulgaris*'in %90 etil alkolle hazırlanan ekstraktının kullanılması durumunda 18 mm'lik zonlar elde edilirken, çalışmamızda *Thymus vulgaris*'in %70'lik etil alkol ile hazırlanan ekstraktının biyofilm pozitif, AI-2 aktif *Listeria innocua* izolatu üzerine inhibisyon zonu çapının 7 mm olduğu belirlenmiştir. Ezine peyniri üretim hatlarından izole edilen *Listeria innocua*'nin güçlü biyofilm üreticisi oluşu ve sürekli temizlik yapılan bir üretim hattından izole edilmesi nedeniyle kimyasallara oldukça dayanıklı olmasının zon çapların daha düşük olmasına sebep olabileceği, bunun yanı sıra kullanılan *Thymus vulgaris*'in farklı kaynaklardan elde edilmiş olmasını da etkili olduğu düşünülmüştür. Kavanaugh ve Ribbeck (2012) tarafından yapılan çalışmada ise *Thymus vulgaris* esansiyel yağının *Pseudomonas* ve *Staphylococcus spp.* üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmış; ticari *Thymus vulgaris* yağının *Pseudomonas* ve *Staphylococcus spp.* üzerine inhibisyon zon çaplarının 18-20 mm civarında olduğu bildirilmiştir.

Kim ve Park (2013) tarafından yapılan çalışmada ise toluene ile hazırlanmış zencefil (*Zingiber officinale*) ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* PA14'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Zencefil ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* PA14 gelişimi üzerine hiçbir etki olmadığı bulunmuştur. Ekstraktın kullanımı sırasında ilk 8 saatte biyofilm oluşum yaklaşık % 39 değerinde azalırken; 24 saatin sonucunda % 56 oranında azaldığı araştırmacılar tarafından aktarılmıştır.

Bryan ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise ticari olarak hazırlanmış Rus propolis'inin etil alkollü ekstraktının penisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* ve antibiyotiğe duyarlı *Escherichia coli* üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ticari Rus propolis ekstraktının mikroorganizma sıvı ortamına % 20 oranında eklenilmesi ve 18 saat beklenmesi sonucunda her iki tür bakterinin biyofilm oluşumunu % 100 oranında inhibe ettiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda propolis 1'in (%70 etil alkol ile hazırlanan) standart bakteri suşları *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ve *Escherichia coli*



ATCC 25922 üzerinde etkili olduğu tespit edilirken (10 ve 8,5 mm); propolis 2'nin (ticari Türk propolis'i) sadece *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (15 mm).

Rathore ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada boraksın *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Wang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise deiyonize su ile hazırlanan boraks, yttrium ve TiO<sub>2</sub> maddeleri içeren karışımların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerine antimikrobiyal etkisi olduğu belirtilmiştir. Çalışmada sadece boraks ile TiO<sub>2</sub> içeren karışımın *S.aureus* ve *E.coli* üzerine inhibisyon zon çapları 8,21 ve 10,61 mm olarak ölçülmüştür. İlgili çalışmada üç madde karışımının 8,02 ve 7,75 mm zon çapı oluşturabilmektedir. Çalışmamızda 1mg/mL'lik %70 etil alkolle hazırlanmış boraks ekstraktı *S.aureus* ATCC 6538 P ve *E.coli* ATCC 25922 için 8 ve 10 mm çaplarında inhibisyon zonu oluşturmuştur. 2mg/ml'lik %70 etil alkolle hazırlanmış boraks ekstraktının ise *S.aureus* ATCC 6538 P ve *E.coli* ATCC 25922 için 8 ve 9 mm çaplarında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir.

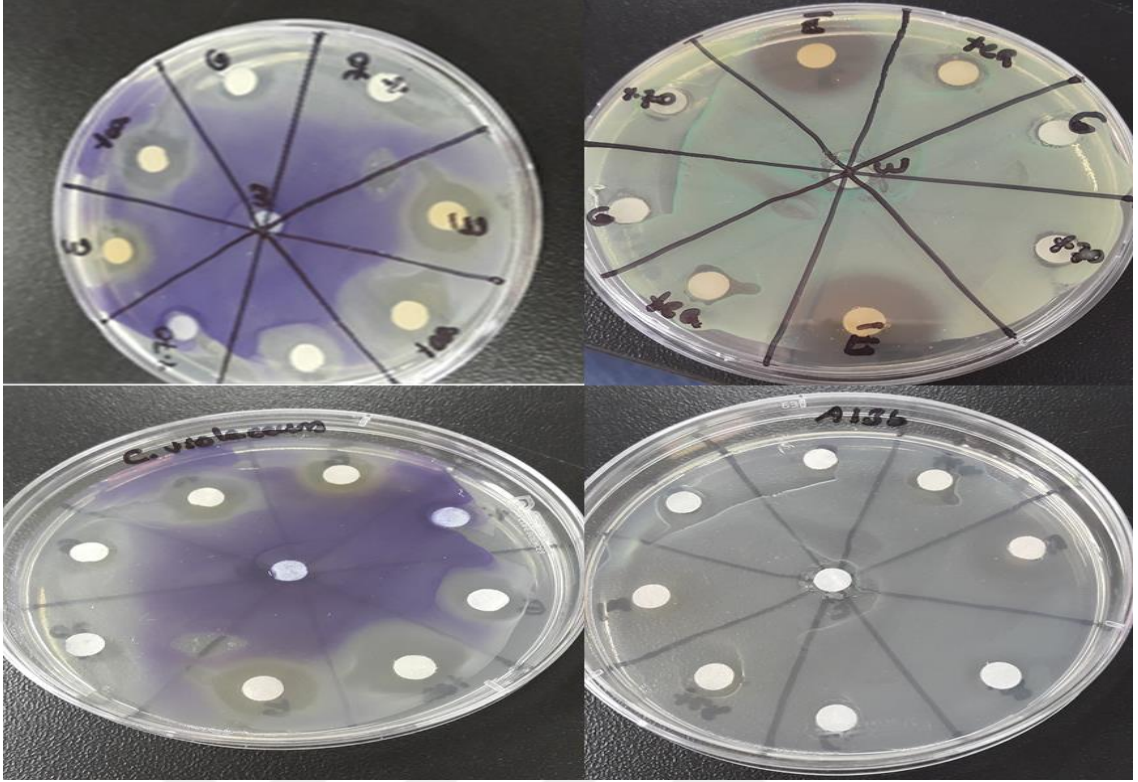
#### **4.2.2. Doğal Ekstraktlarının Antiquorum sensing Özelliklerinin Belirlenmesi**

Çalışmamızın bu aşamasında antimikrobiyal etkileri belirlenen doğal maddelerin biyofilm oluşumuna önemli katkısı bulunan quorum sensing sinyallerinden AHL ve AI-2 sinyallerini kesme durumları incelenmiştir.

##### **4.2.2.1. Doğal Ekstraktların AHL Sinyalleri Üzerine Antiquorum sensing Etkisi**

Çalışmada doğal maddelerin Gram negatif bakterilerin kullandığı kısa AHL (AcylHomoserin Lactone) (C4, C6 ve C8-HSL) ve uzun AHL (C8-C14-HSL) sinyallerini kesici özellikleri incelenmiştir. Kısa AHL sinyalleri görünürlüğü için *Chromobacterium violaceum* CV026, uzun AHL sinyalleri görünürlüğü için *Agrobacterium tumefaciens* A 136 indikatör olarak kullanılmıştır. Luria Bentani agar üzerinde indikatör mikroorganizmaların pigment oluşumu sağlanmış ve disklere emdirilmiş doğal maddelerin bu pigmentler üzerinde zon oluşumları incelenmiştir.

Çalışmada *Chromobacterium violaceum* CV026 mor pigment oluştururken; *Agrobacterium tumefaciens* A 136 açık mavi-yeşil pigment oluşturmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Disk difüzyon metodu ile antiqorum sensing analizi

Oluşan zonların çaplarına göre doğal maddelerin quorum quenching özellikleri belirlenmiştir. İlgili çalışmada antimikrobiyal çalışması sırasında son derece yapışkan özelliği olduğu tespit edilen propolis 2 ve 1 mg/ml’lik ekstrakt ile aralarında belirgin bir fark bulunmadığı görülen Boraks 2 kullanılmamıştır. Yine antimikrobiyal-antibiyofilm etkisi bulunamadığı halde *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, vanilin ve curcumin ekstraktları seçilerek herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmayıp QQ etkisi bulunan ekstraktlarının olup olmadığı da araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar çizelge 4.15’de verilmiştir.

Doğal maddelerin %70 etil alkol ile hazırlanmış ekstraktlarının kısa ve uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine etkileri incelendiğinde %70 etil alkolün ve *Cichorium intybus*’un herhangi bir QQ etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Epigallocatechin gallate’ın(EGCG) uzun ve kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine en etkili doğal ekstrakt olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). vanilin, *Panax ginseng*, curcumin, *Camellia sinensis* ekstraktlarının ve elma sirkesinin kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine olan etkileri uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine olan etkilerinden daha fazladır. Boraks’ın kısa ve uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine etkisi eşit olup; diğer doğal maddelere oranla çok yüksek bir QQ etkisine sahip olmadığı görülmüştür. Propolis, *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Hypericum perforatum*, resveratrol ve nisin’in uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine QQ etkisinin daha

yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada disklerin boyutlarının 6 mm olduğu göz önünde bulundurulacak olursa; nisin, boraks ve *Hypericum perforatum*'un kısa AHL sinyalleri üzerine QQ etkisinin çok yüksek olmadığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.15. Doğal maddelerin AHL sinyalleri için QQ analizlerinde zon çapları sonuçları

| Doğal Madde                        | Kısa Zincirli AHL<br>( <i>C.violeceum</i> CV026) | Uzun Zincirli AHL<br>( <i>A.tumefaciens</i> A 136) |
|------------------------------------|--|--|
| Epigallocatechin gallate<br>(EGCG) | 16,5±1,5   | 20±0,0   |
| Vanilin                            | 11,5±0,5   | 9,0±1,0  |
| <i>Panax ginseng</i>               | 11,0±1,0   | 8,5±0,5  |
| Curcumin                           | 9,0±0,0  | 8,5±0,5  |
| <i>Camellia sinensis</i>           | 17,5±0,5   | 10,0±0,0   |
| Propolis                           | 8,0±1,0  | 9,0±1,0  |
| Elma Sirkesi                       | 13,0±0,5   | 12,0±0,5   |
| <i>Cichorium intybus</i>           | <6,0   | <6,0   |
| <i>Calendula officinalis</i>       | 7,5±0,0  | 13,5±0,5   |
| <i>Thymus vulgaris</i>             | 7,5±0,0  | 9,5±0,5  |
| <i>Hypericum perforatum</i>        | 7,0±0,0  | 8,0±0,5  |
| Boraks                             | 7,0±0,0  | 7,0±0,5  |
| Resveratrol                        | 8,5±1,0  | 10,5±0,5   |
| Nisin                              | 6,5±0,0,0  | 26,5±0,5   |
| %70 Etil Alkol                     | <6,0   | <6,0   |

\*Ortalama±Standart Sapma, mm

Nagy (2010) tarafından yapılan çalışmada yaklaşık 50 adet doğal bitki ekstraktının kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Ekstraktlar %40 etil alkol kullanılarak hazırlanmıştır. Araştırmacı çalışmamızla ortak olarak kekik (*Thymus vulgaris*) ve kırmızı ginseng'in (*Panax ginseng*) QQ etkisi incelenmiş; kekik için 16 mm inhibisyon zonu elde edilmiştir. Çalışmamızda ise Kazdağları kökenli kekiğin (*Thymus vulgaris*) 7,5 mm

inhibisyon zonu olduğu görülmüştür. Kırmızı ginseng'in Nagy (2010) tarafından yapılan çalışmada kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine herhangi bir inhibisyon zonu olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise antimikrobiyal etkisi olmayan kırmızı ginseng ve ginseng maddelerinden ginseng'in AHL QQ etkisi araştırılmış; maddenin kısa zincirli AHL sinyalleri için 11 mm, uzun zincirli AHL sinyalleri için 8,5 mm inhibisyon zonları elde edilmiştir.

Propolis ise arılar tarafından üretilen ve kovanlarını mikroorganizmalardan korumak için kullandıkları bir maddedir. Propolis'in ve etil alkolle üretilen ekstraktının özellikle kısa zincirli AHL sinyallerini inhibe ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Lamberte ve ark., 2011; Lazar ve ark., 2013). Lamberte ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada %95 etil alkol ile kullanılan Filipinler propolis'inin ekstraktı hazırlanmış; kısa zincirli AHL varlığının belirlenmesi için kullanılan *C.violaceum* kullanılarak sinyal inhibisyonu araştırılmıştır. Çalışmada etil alkol ile hazırlanmış propolis ekstraktının kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine inhibisyon etkisi olduğu bulunmuştur (10 mm). Bulman ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise propolis'in % 70 etil alkol ile ekstraktı hazırlanmış ve *C.violaceum* CV026'nın sinyal üretimi üzerine inhibisyon etkisi OD değerlerine bakılarak araştırılmıştır. Çalışmada %70 etil alkol ile hazırlanan propolis'in *C.violaceum* CV026'nın sinyal üretimini %67 oranında azalttığı bulunurken; uzun zincirli sinyallerden C10-HSL için inhibisyon oranı ise % 80 seviyesinde olduğu bildirilmiştir. Çalışmamız sırasında ise propolis'in %70 etil alkol ile hazırlanmıştır. Ekstraktlarının kısa ve uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine QQ etkisi araştırılmış; kısa zincirli AHL sinyaller üzerine 8 mm, uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine 9 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Bu durum Bulman ve ark. (2011) tarafından elde edilen sonuca benzerlik göstermektedir.

Koh ve ark. (2013) tarafından yapılan derlemede, çalışmamızda da yer verilen *Panax ginseng*, curcumin, vanilin ve *Prunella vulgaris*'in kısa AHL sinyalleri üzerine antagonistik etkisi derlenmiş; tüm maddelerin indikatör *C.violaceum* CV026 üzerine antagonistik etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. Choo ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada vanilyanın metil alkol ile hazırlanan ekstraktının *C.violaceum* CV026 üzerinde hiçbir inhibisyon zonu oluşturmadığını bildirmiştir. Chang ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlanan %10'luk (v/v) curcumin ekstraktının AHL sinyalleri üzerine etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışma da ise *Thymus vulgaris*, vanilin, *Panax ginseng* ve curcuminin %70 etil alkol ile hazırlanan ekstraktlarının kısa zincirli AHL sinyalleri üzerine sırası ile 7,5;11,5; 11 ve 9 mm inhibisyon zonu

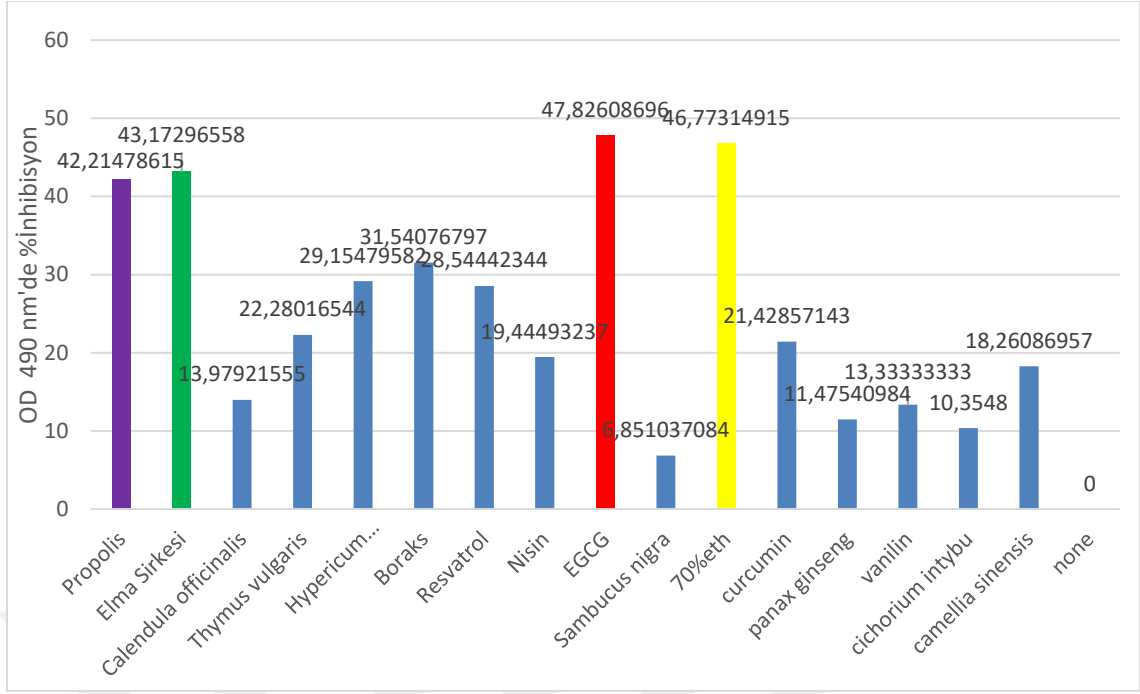
oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca curcuminin %70 etil alkol ile hazırlanan ekstraktlarının uzun zincirli AHL sinyalleri üzerine inhibisyon etkisinin varlığı tespit edilmiştir (8,5 mm).

Lade ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada Epigallocatechin gallate (EGCG)'ın DMSO ile hazırlanan ekstraktının uzun ve kısa AHL sinyalleri üzerine inhibisyon etkisi olduğunu belirlenmiştir. Aynı çalışmada ve Lade ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada DMSO ile hazırlanan curcumin ekstraktının atık arıtma sistemleri biyoreaktörlerinde AHL sinyal kontrolü için kullanılabilmesi; fakat ilgili maddenin kullanımı ile sadece kısa zincirli AHL sinyallerinin engellenebileceği belirtilmiştir.

#### **4.2.2.2. Doğal Ekstraktlarının AI-2 Sinyalleri Üzerine Quorum Quenching Etkisi**

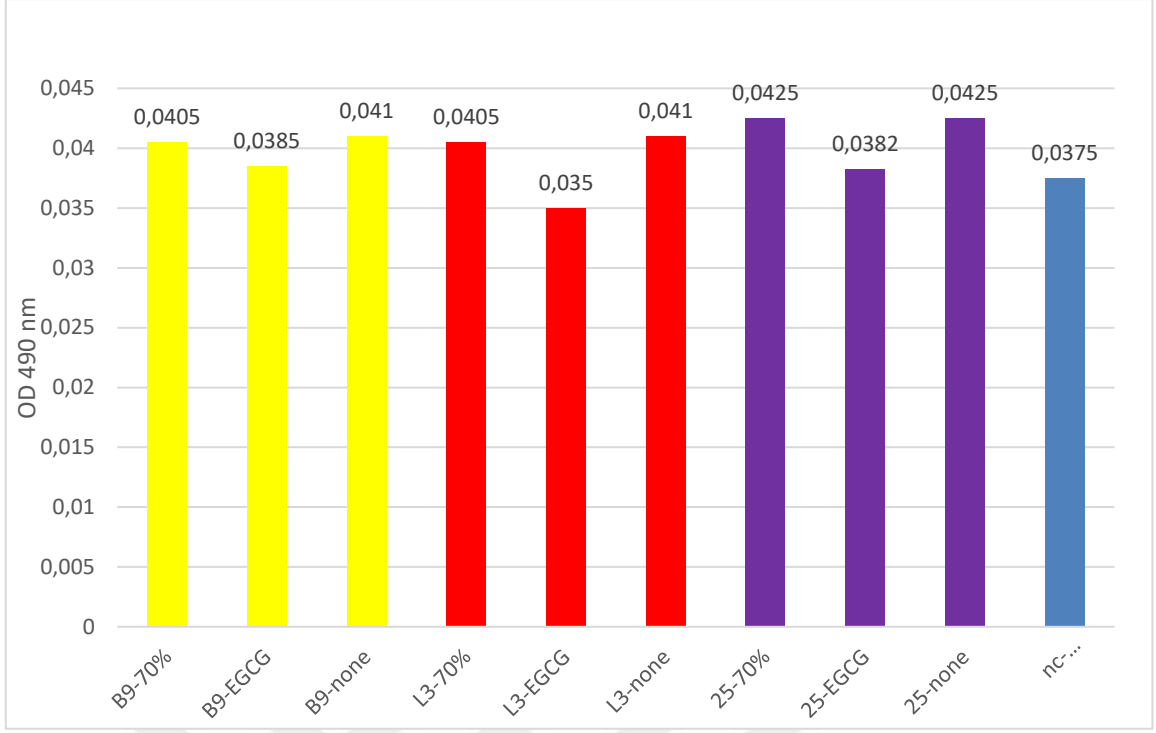
Bu çalışmada elde edilen izolatlardan bir kısmının AI-2 sinyal üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamada doğal ekstraktların bu sinyaller üzerine quorum quenching etkinliği incelenmiştir. AI-2 sinyali indikatörü olarak *Vibrio harveyi* BB 170 ve en yüksek AI-2 sinyaline sahip olan cendere bezinden izole edilen 25 no kodlu *Streptococcus bovis* kullanılmış; siyah mikropilaka kullanılarak optik yoğunluk değerlerine göre yüzde inhibisyon değeri belirlenmiştir (Şekil 4.13).

Şekil 4.13'de görüldüğü üzere en yüksek AI-2 sinyali inhibisyonunu %47,8 ile Epicatechin gallate (EGCG)'ın sağladığı belirlenmiştir. İkinci en yüksek değer %46,7 ile %70'lik etil alkole ait olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.13'de görülen "none" hiçbir madde kullanılmadığında görülen yüzde AI-2 sinyali inhibisyon değeridir. Çalışmada en düşük yüzde inhibisyon değeri %6,8 ile *Sambucus nigra* ekstraktı ile elde edilmiştir.



Şekil 4.13. 25 nolu *S. bovis*'in AI-2 sinyallerinin yüzde inhibisyonunun belirlenmesi metodu ile Antiquorum sensing analizi

En yüksek AI-2 inhibisyon değerini veren Epigallocatechin gallate (EGCG)'ın ve %70'lik etil alkolün, AI-2 sinyal aktiviteleri yüksek olan üç farklı tür izolat üzerine inhibisyon etkileri de araştırılmıştır (şekil 4.14). L3 kodlu *Listeria innocua* çelik borudan, 25 no kodlu *Streptococcus bovis* cendere bezinden ve B9 kodlu *Aneurinibacillus aneurinilyticus* sudan izole edilmiştir. *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Listeria innocua* ve *Streptococcus bovis*'in AI-2 sinyallerinin inhibisyon değerinin en fazla EGCG kullanılarak elde edildiği Şekil 4.14'de görülebilmektedir. Bu durumdan da anlaşılacağı üzere mikroorganizma türünün değişmesi ilgili maddenin AI-2 sinyalleri üzerine inhibisyon durumunu büyük ölçüde değiştirmemiştir. Yine Şekil 4.15'e bakılarak EGCG'nin AI-2 sinyal inhibisyon değerinin sırası ile *Listeria*, *Streptococcus* ve *Bacillus* spp. sinyalleri üzerinde daha yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 4.14. En yüksek AI-2 sinyalleri veren izolatların en yüksek %inhibisyon değeri olan EGCG ve %70'lik etil alkol ile gelişim durumu

Zhu ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada Çin tarçını bitkisi yağının DMSO ile 1:50 oranında hazırlanmış ekstraktının AI-2 sinyalleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada mastitis etmeni olan *Staphylococcus aureus* ve *Esheria coli* 29 bakterilerinin sinyalleri üzerine inhibisyon analizi yapılmış;  $\frac{1}{2}$  MİK değerinin mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlayamazken AI-2 inhibisyonunu sağlayabildiği belirtilmiştir. Çalışmada Gram pozitif *S.aureus*'un AI-2 sinyallerinin miktarının sınırlanamadığı,  $\frac{3}{4}$  MİK değerinde en düşük düzeyde olduğu, MİK değerinde görülen sinyal değerinin  $\frac{1}{2}$  MİK değerinde görülen AI-2 değerinin üstüne çıktığı görülmüştür. Gram negatif *E.coli* 29 bakterisinin AI-2 sinyali MİK değerleri doğrultusunda azaldığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Almasoud ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ıspanak ve kavundan izole edilmiş *Salmonella Typhimurium*'un AI-2 sinyal varlığı tespit edilmiş; laktik asit, malik asit ve kombinasyonunun sinyaller üzerine etkisi araştırılmıştır. Laktik asit %1-4, malik asit %1-4 ve malik asit-laktik asit kombinasyonun %1 ve 4 oranında hazırlanarak AI-2 sinyallerinin inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiştir. AI-2 sinyallerinin sırası ile %26,2-80,2; %23,4-37,5 ve %17,2-25,4 arasında inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ise etkili madde olan EGCG'nin AI-2 sinyalleri inhibisyon oranı %47,8 oranında gerçekleşmiştir. Bu oran

malik asit ve malik asit/laktik asit kombinasyonlarından fazla; % 4'lük laktik asit uygulamasından azdır.

Bu çalışmada AI-2 sinyal inhibisyonu araştırması için hazırlanan doğal madde ekstraktlarının hazırlandığı % 70 etil alkolün inhibisyon yüzdesinin EGCG hariç tüm doğal maddelerden yüksek olduğu belirlenmiş. İncelenebilen AI-2 inhibisyon çalışmalarında ekstraktların hazırlandığı çözücülerin inhibisyon etkisinin araştırılmadığı tespit edilmiştir. Benzer olarak Soni ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada dana kıyma örneklerinin farklı solventler ile hazırlanan ekstraktlarının AI-2 inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada su ile hazırlanan ekstraktın inhibisyon değeri %88 olarak tespit edilirlen; hekzan ile hazırlanan ekstraktın % 95, etil asetat ile hazırlanan ekstraktın %30 ve metil asetat ile hazırlanan ekstraktın % 15 civarında inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. Vilchez ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada ortamda bulunan iz maddelerin AI-2 aktivitesini etkileyebildiği bildirilmiştir. Bu çalışma çözücü maddelerin de AI-2 aktivitesi olabileceğine dair bir işaret olarak yorumlanabilir.

#### **4.2.3. Doğal Ekstraktlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MIK), Minimum Bakterisidal Etki Konsantrasyonunun (MBK) ve Yüzde İnhibisyon (%İhb.) Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında hem antimikrobiyel ham de quorum sensing özelliği olan doğal maddelerin MIK, MBK ve yüzde inhibisyon değerleri bölüm 3.3.3.4'de belirtilen yöntemler ile tespit edilmiştir. İlgili değerler Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çalışma sonucunda EGCG, *Calendula officinalis* ve propolis 1 ekstraktları dışında tüm doğal maddelerin MIK ve MBK değerlerinin eşit olduğu bulunmuştur. En yüksek inhibisyon değerine sahip doğal maddenin EGCG olduğu tespit edilmiştir. EGCG 1 nolu izolat *Listeria innocua* gelişimini %93 oranında azaltırken; 6 nolu izolat *Enterobacter cloacea* gelişimini % 87, 18 nolu izolat *Pseudomonas stutzeri* gelişimini %82,2, 27 nolu izolat *Streptococcus lactis* gelişimini %93, 32 nolu izolat *Bacillus cloacea* gelişimini %53,2 oranında azaltmıştır. Standart kültürler ile yapılan denemelerde ise inhibisyon oranı *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 ve *Esherichia coli* ATCC 25922 için sırası ile %88,8, %98, %81,6 ve %97 olmuştur. Propolis 1 ise diğer en yüksek inhibisyon değerlerine sahip doğal madde olduğu görülmüştür. Propolis 1 ekstraktının en yüksek inhibisyon değeri 27 nolu izolat *Streptococcus lactis*'in (%97,2) gelişimi üzerinde gerçekleşirken; en az inhibisyon



değeri *Esherichia coli* ATCC 25922 (%14,8) gelişimi üzerinde gerçekleşmiştir. En düşük inhibisyon değeri ise boraks 1 ekstratı ile elde edilmiştir (%1,4-2,8).

Çizelge 4.16. Doğal antimikrobiyal maddelerin MİK, MBK ve %İnhibisyon değerleri

| Kültürler                                | Madde    | MİK Değeri | MBK Değeri | %İnhibisyon |
|--|----------|------------|------------|-------------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | EGCG     | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %93         |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | EGCG     | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %87         |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | EGCG     | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %82,8       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | EGCG     | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %93         |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | EGCG     | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %53,2       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | EGCG     | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %88,8       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | EGCG     | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %98         |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | EGCG     | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %81,6       |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922        | EGCG     | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %97         |
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %2,8        |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,8        |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %2,2        |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,25       |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,7        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %2          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,4        |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,8        |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922        | Boraks 1 | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %1,6        |

Çizelge 4.16.'in devamı

| Kültürler                                | Madde                        | MİK Değeri | MBK Değeri | %İnhibisyon |
|--|------------------------------|------------|------------|-------------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %21,2       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %49,4       |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %38,8       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %33,6       |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %21,7       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %47,7       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %22,6       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %24         |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922        | <i>Calendula officinalis</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %72,4       |
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %87,7       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %44,2       |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %53,6       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 250 µg/mL  | %97,2       |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %24,3       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %66,7       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %28,6       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %27,5       |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922        | Propolis1                    | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %14,8       |

Çizelge 4.16.'in devamı

| Kültürler                                   | Madde                  | MİK Değeri | MBK Değeri | %İnhibisyon |
|---|------------------------|------------|------------|-------------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)                 | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %7,14       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)             | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %7,5        |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)            | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %7,6        |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)            | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %6,5        |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)              | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %8,4        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538<br>P | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %7,6        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC<br>27853 | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %11,7       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698         | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %8,9        |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922           | Resveratrol            | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %6,5        |
| <i>Listeria innocua</i> (1)                 | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %21,6       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)             | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %12,4       |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)            | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %18,8       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)            | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %10,2       |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)              | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %15,1       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538<br>P | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %8,7        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC<br>27853 | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %18,2       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698         | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %14,1       |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922           | <i>Thymus vulgaris</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %16,5       |

Çizelge 4.16.'in devamı

| Kültürler                                | Madde                       | MIK Değeri | MBK Değeri | %İnhibisyon |
|--|-----------------------------|------------|------------|-------------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %18,9       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %53,04      |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %43,4       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %48         |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %26,2       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %12,5       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %39,2       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %47,5       |
| <i>Esheria coli</i> ATCC 25922           | Nisin                       | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %37,2       |
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %11,8       |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %17,01      |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %16,5       |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %8,5        |
| <i>Bacillus coagulans</i> (32)           | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %11,3       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %16,5       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %10,5       |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %34         |
| <i>Esheria coli</i> ATCC 25922           | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %8,8        |
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | <i>Hypericum perforatum</i> | 500 µg/mL  | 500 µg/mL  | %11,8       |

Tüm doğal maddelerin MIK değeri %50 olup, ilgili değer 500 µg/mL madde kullanımının minimum inhibisyon konsantrasyonu için gerektiğini göstermektedir. En yüksek inhibisyon değerine sahip EGCG'nin minimum bakterisidal konsantrasyon değeri (1) nolu izolat *Listeria innocua*, 27 nolu izolat *Streptococcus lactis* ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 250 µg/mL (%25)'dir; diğer mikroorganizmalar için 500 µg/mL (%50) olduğu belirlenmiştir. Propolis 1'in minimum bakterisidal konsantrasyon değeri 1 nolu izolat

*Listeria innocua* ve 27 nolu izolat *Streptococcus lactis* 250 µg/mL (%25)'dir; diğer mikroorganizmalar için 500 µg/mL (%50) olduğu belirlenmiştir. En düşük yüzde inhibisyon değerine sahip boraks 2 maddesinin minimum bakterisidal konsantrasyon değeri tüm mikroorganizmalar için 500 µg/mL (%50) olduğu belirlenmiştir.

Yılmaz (2012) tarafından yapılan bir çalışmada boraksın ve borik asitin *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter septicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Çalışmada borik asitin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter septicus* DSM 19415, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için MİK değerleri sırasıyla 3,80 mg/mL, 3,80 mg/mL, 7,60 mg/mL ve 7,60 mg/mL olarak tespit edilmiştir. MBK değerleri de aynı değerlerde bulunmuştur. Boraksın, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter septicus* DSM 19415, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için MİK değerleri ise sırasıyla 23,80 mg/mL, 23,80 mg/mL, 47,60 mg/mL ve 47,60 mg/mL olarak tespit edilirken; MBK değerleri de yine aynı değerlerde tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada boraks ve borik asitin mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisi olduğu bulunmuş; tespit edilen MİK ve MBK değerlerinin çalışmamızda elde edilen değerlerden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Adukwu ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada limon otu ve greyfurt esansiyel yağlarının (EO) hastanelerden izole edilen metisilin dirençli ve biyofilm pozitif *Staphylococcus aureus* izolatları üzerine minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ile birlikte minimum bakterisidal etki konsantrasyonu (MBK) araştırılmıştır. Çalışmada ekstraktlar araştırmacılar tarafından hazırlanmamış, ticari olarak hazır ekstraktlar kullanılmıştır. Kullanılan ticari olarak satılan ekstraktların mikroorganizmalar üzerindeki MİK ve MBK değerleri sırası ile %0,06 ve > %4 (Limon otu EO); % 1 ve > %4 (Greyfurt EO) olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen miktarlar çalışmamızda kullanılan oranlardan oldukça düşüktür. Bu duruma ticari ekstrakt olarak kullanılan ürünün nasıl hazırlandığının bilinmemesi (DMSO, etil alkol veya metil alkol), esansiyel yağların yapısı ve içeriği farklı olduğundan etkilerinin farklı olmasının neden olduğu düşünülmektedir. Bazı doğal madde ekstraktlarında içerdiği maddeler nedeniyle sinerjistik etki oluşurken; bazı maddelerde ise antagonistik etki görülmektedir. Yine doğal madde ekstraktlarının karşılaştığı ortamın özellikleri (pH, aw, basınç, çelat oluşturabilen maddeler v.b.) de aynı maddelerin farklı araştırmalarda farklı sonuçlar vermesi durumunu açıklamaktadır (Burt, 2004).

Hasanshahian ve Khosravi (2015) tarafından yapılan çalışmada *Artemisia santonica*'nın (yavşan otu veya pelin otu) %80'lik etil alkol ile hazırlanan ekstraktlarının

(100mg/ml) bazı patojenler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Esherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerine antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Ekstraktın mikroorganizmalar üzerinde 9-13 mm inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Esherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine MIK ve MBK değerleri sırasıyla 1,56 ve 3,12 mg/mL; 3,12 ve 4,12 mg/mL; 6,25 ve 7,56 mg/mL; 6,25 ve 7,78 mg/mL olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda doğal maddelerin içinde bulunan ve antimikrobiyal aktivitesi bulunan fenolik maddeler gibi bileşenlerin aktivitelerinden daha çok yararlanabilmek için ekstraktlarımız %70 etil alkol ile hazırlanmıştır (Shah ve ark., 2013; Akter ve ark. 2016; Lin ve ark., 2017). Fakat çalışmamızda dezenfektan maddelerin etkinliğinin belirlenmesi için kullanılan standart suşlar yanı sıra gerçek üretim hatlarından elde edilmiş, biyofilm üreticisi olan, quorum sensing aktif ve dezenfektan maddeler ile sıklıkla karşılaşmış izolatlar kullanıldığından dolayı MIK ve MBK değerinin 0,5-0,25 mg/mL düzeyinde oluşu son derece olumlu görülmüştür.

Özdikmenli ve Zorba (2014) tarafından yapılan çalışmada bir başka kekik türü olan *Origanum onites* esansiyel yağının *Salmonella* Typimurium üzerine antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve MIK değeri 2,50 µl/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan kekik türü Kaz dağlarından toplanan *Thymus vulgaris* olup; Gram pozitif bakteriler [(1) *Listeria innocua*, (27) *Streptococcus lactis*, (32) *Bacillus cloacea*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ve *Micrococcus luteus* ATCC 4698] üzerine MIK değeri 500 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca kekik türlerinin farklılığı, ekstrakt eldesi farklılığı, genel itibari ile esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğinin ekstraktlara oranla daha fazla oluşu (Burt, 2004) ve çalışmamızda kullanılan türlerin dirençli mikroorganizmalar oluşu etkilidir.

Lade ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada EGCG'nin bioreaktörlerden izole edilen, biyofilm oluşturduğu belirlenmiş Gram negatif izolatlar üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada EGCG dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlanmıştır. Araştırmacılar MIK değerini *Aeromonas hydrophila* için 500 µg/mL, *Pseudomonas japonica* için 550 µg/mL ve *Enterobacter ludwigi* için 600 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise EGCG'nin %70 etil alkol ile hazırlanmış ekstraktının tüm Gram negatif mikroorganizmalar üzerine etkili MIK değeri 500 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Lade ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada yüzde inhibisyon değerinin ise %52-68 arasında değişmektedir. Tarafımızdan hazırlanan EGCG ekstraktı ise Gram negatif bakteriler üzerine %82,8-98 arasında inhibisyon etkisine sahip olduğu; Gram pozitif izolatlar üzerine %81,6-93 arasında inhibisyon etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu oran Lade ve ark. (2015) tarafından

tespit edilen değerden yüksektir. Çalışmamızda kullanılan EGCG maddesinin benzer kaynaktan gelmesine rağmen etki değerinin farklı oluşu ekstraktın hazırlandığı çözücü maddelerin etki değerinden kaynaklandığı söylenbilir.

Chalova ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada portakal yağının %95 etanol, DMSO ve tween 80 kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 19 115, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ve *Lactobacillus plantarum* WCFS1 zerine antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 200 µL portakal yağı çözücülerde %20 v/v olacak şekilde çözülerek ekstraktlar hazırlandığı belirtilmektedir. Çalışmada, etanolün çözücü olarak kullanımını sonucu *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ve *Lactobacillus plantarum* WCFS1 zerine elde edilen MIK değerleri sırasıyla %0,3, %0,25 %0,1 olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak DMSO'nun kullanımıyla elde edilen değerler %1, %1, %0,3 ve tween 80'in çözücü olarak kullanımını sonucu değerler %0,75, %0,75, %0 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere farklı mikroorganizma türlerin üzerine farklı solventler ile çözülmüş aynı doğal maddelerin antimikrobiyal etkisi birbirinden farklı olarak elde edilmektedir.

#### **4.3. Peynir retim Hatlarından Elde Edilen Biyofilm Oluşturan İzolatlar zerine Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Geliştirilmesi**

Çalışmanın bu basamağında güçlü seviyede biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen izolatlar ve dezenfektan dirençli kontrol suşları üzerine antimikrobiyal, quorum quenching etkili MIK, MBK ve yüzde inhibisyon değeri belirlenmiş doğal maddelerin birbiri ile kombine edilmesi durumunda oluşacak durumun tespiti amaçlanmıştır. Maddelerin birbirlerinin etkileri üzerine antagonistik veya sinerjistik davranışları incelenerek bir kombinasyon hazırlanması planlanmıştır.

##### **4.3.1. Doğal Madde Kombinasyonlarının Antimikrobiyal Etki Analizleri**

Çalışma 2'de elde edilen sonuçlar kullanılarak Epigallocatechin gallat, propolis, *Hypericum perforatum*, *Thymus vulgaris*, *Calendula officinalis* ve nisinin ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarının antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon metodu kullanılarak araştırılmıştır (izelge 4.17).

Çizelge 4.17. Doğal madde kombinasyonlarının antimikrobiyal etki zon çapları (mm)\*

| Kültürler                                | E+A     | E+P      | A+P     | E+N      | E+K     | E+SK    |
|--|---------|----------|---------|----------|---------|---------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)              | 8,0±0,0 | 8,0±0,0  | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 7,5±0,0 | 8,0±0,0 |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)          | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 7,5±0,5  | 7,0±0,0 | 8,0±0,0 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)         | 8,0±0,0 | 10,0±0,0 | 7,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 8,0±1,0 |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)         | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 8,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,5±0,5 | 9,0±0,0 |
| <i>Bacillus coagulans</i> (36)           | 7,0±0,0 | 7,0±0,0  | 9,0±0,0 | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 8,0±0,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | 7,5±0,5 | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 10,0±0,0 | 9,5±0,5 | 7,5±0,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 9,0±0,5 | 10,0±0,0 | 7,0±0,0 | 7,0±0,0  | 9,0±0,0 | 8,0±0,0 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | 7,0±0,8 | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 7,0±0,0  | 8,0±0,0 | 8,0±1,0 |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC 25922        | 7,5±0,5 | 8,5±0,5  | 8,0±1,0 | 8,0±0,0  | 8,5±0,5 | 7,0±0,0 |

\*Ortalama Değer±Standart Sapma, EGCG (E), *Calendula officinalis* (A), Propolis (P), Nisin (N), *Thymus vulgaris* (K), *Hypericum perforatum* (SK)



Çizelge 4.17'nin Devamı\*

| Kültürler                                   | P+K     | K+N      | SK+N     | A+N     | A+SK     | A+K      |
|---|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)                 | 9,0±0,0 | 7,5±0,5  | 9,0±0,0  | 9,0±0,0 | 7,0±0    | 9,0±0,0  |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)             | 8,0±1,0 | 7,0±0,0  | 8,5±0,5  | 9,0±1,0 | 7,0±0,0  | 7,5±0,5  |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)            | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 8,5±0,5  | 8,5±0,5 | 8,5±0,5  | 7,0±0,0  |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)            | 7,5±0,5 | 7,5±0,5  | 8,0±0,0  | 7,5±0,5 | 8,0±1,0  | 8,0±0,0  |
| <i>Bacillus coagulans</i> (36)              | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 9,0±0,0  | 7,0±0,0 | 7,5±0,5  | 8,0±0,0  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 6538 P | 8,0±0,0 | 9,0±0,0  | 8,0±1,0  | 7,0±0,0 | 7,0±0    | 8,5±0,5  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 9,5±0,5 | 8,0±1,0  | 9,5±0,5  | 8,5±0,5 | 10,0±0   | 10,0±0,0 |
| <i>Micrococcus luteus</i><br>ATCC 4698      | 8,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,5±0,5  | 8,0±0,0 | 9,0±0,0  | 7,0±0,0  |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC<br>25922        | 7,5±0,5 | 8,5±0,5  | 10,0±0   | 8,0±0,0 | 8,0±1,0  | 7,0±0,0  |
| Kültürler                                   | P+N     | P+SK     | SK+K     | E+P+N   | E+P+A    | E+P+K    |
| <i>Listeria innocua</i> (1)                 | 9,0±0,0 | 10,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 8,0±0    | 7,0±0,0  |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)             | 9,0±0,0 | 9,0±1,0  | 7,5±0,5  | 8,5±0,5 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0  |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)            | 8,5±0,5 | 8,0±0,0  | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 9,0±0,0  | 7,0±0,0  |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)            | 8,5±0,5 | 7,5±0,5  | 10,0±0,0 | 8,0±0,0 | 10,0±0,0 | 7,0±0,0  |
| <i>Bacillus coagulans</i> (36)              | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 8,0±0,0  | 8,5±0,5 | 9±0      | 7,5±0,5  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 6538 P | 9,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 11,5±0,5 | 7,0±0,0  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 9,0±0,0 | 7,5±0,5  | 7,5±0,5  | 7,0±0,0 | 9,0±0,0  | 9,0±1,0  |
| <i>Micrococcus luteus</i><br>ATCC 4698      | 7,5±0,5 | 8,0±1,0  | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 7,5±0,5  | 7,0±0,0  |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC<br>25922        | 8,0±1,0 | 8,5±0,5  | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 9,0±0,0  | 7,0±0,0  |

\*Ortalama Değer±Standart Sapma, EGCG (E), *Calendula officinalis* (A), Propolis (P), Nisin (N), *Thymus vulgaris* (K), *Hypericum perforatum* (SK)

Çizelge 4.17'nin Devamı\*

| Kültürler                                   | E+K+N   | E+A+N   | A+N+SK  | SK+K+N   | A+P+N+E | E+P+N+K  |
|---|---------|---------|---------|----------|---------|----------|
| <i>Listeria innocua</i> (1)                 | 7,0±0,0 | 9,0±0,0 | 7,5±0,5 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 9,0±0,0  |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (6)             | 7,5±0,5 | 8,5±0,5 | 8,0±0,0 | 7,5±0,5  | 7,0±0,0 | 10,0±0,0 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18)            | 7,5±0,5 | 9,0±0,0 | 9,0±0,0 | 8,0±0,0  | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  |
| <i>Streptococcus lactis</i> (27)            | 8,0±0,0 | 7,5±0,5 | 8,0±0,0 | 11,5±0,5 | 8,5±0,5 | 7,0±0    |
| <i>Bacillus coagulans</i> (36)              | 7,0±0,0 | 8,0±0,0 | 7,5±0,0 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 7±0      |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 6538 P | 8,0±0,0 | 8,0±1,0 | 8,0±0,0 | 7,0±0,0  | 7,0±0,0 | 8,5±0,5  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 7,0±0,0 | 8,0±0,0 | 8,5±0,5 | 7,5±0,5  | 7,0±0,0 | 9,5±0,5  |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC<br>4698      | 8,0±0,0 | 8,0±0,0 | 7,5±0,5 | 8,0±0,5  | 8,5±0,5 | 8,0±0,0  |
| <i>Esherichia coli</i> ATCC<br>25922        | 8,0±0,0 | 8,0±0,0 | 8,0±0,0 | 8,0±0,0  | 7,0±0,0 | 8,0±1,0  |

\*Ortalama Değer±Standart Sapma, EGCG (E), *Calendula officinalis* (A), Propolis (P), Nisin (N), *Thymus vulgaris* (K), *Hypericum perforatum* (SK)

Kombinasyon çalışması sırasında elde edilen zon değerleri incelendiğinde en etkili madde olarak tespit edilen EGCG'nin antimikrobiyal etkisinin diğer ekstraktlar ile kombine edildiğinde azaldığı görülmüştür. Diğer doğal madde ekstraktlarının EGCG'nin etkisi üzerinde antagonistik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine çizelge 4.17'deki zon değerleri incelenecek olursa EGCG dışındaki doğal ekstrak maddelerin antimikrobiyal etki zonları ise çok önemli bir ölçüde etkilenmemiştir. *Thymus vulgaris*'in diğer doğal maddeler ile kombinasyonu sonucunda, tek başına üzerinde etkili olamadığı *Pseudomonas stutzeri* ve *Esherichia coli* ATCC 25922 üzerine etkili olabildiği görülmüştür. Bununla birlikte etki değerindeki artışlar önemli bir ölçüde değildir. Hiçbir kombinasyon denemesinde EGCG'nin tek başına elde ettiği etki değerine ulaşılammıştır. Bu nedenler ile çalışmamızın geri kalanında ilgili doğal maddelerin birbirleri ile kombine edilmesine gerek kalmadığına karar verilmiştir; fakat ülkemiz için önemli bir ekonomik değer olan, mikroorganizmalar üzerine inhibisyon zon çapları EGCG'dan sonra en yüksek değere sahip olan ve AI-2 sinyalleri üzerine etkili ikinci doğal madde ekstraktı olan boraks ile EGCG'nin kombinasyonunun denemesine gerek görülmüştür. Bu nedenle boraksın 1mg/mL'lik

ekstraktı ile yine 1mg/mL'lik EGCG'nin 1:1 oranında karışımının antimikrobiyal etki analizi, MIK değeri, MBK değeri ve yüzde inhibisyon değeri araştırılmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. EGCG ve Boraks 1 kombinasyonun antimikrobiyal etki zon çapları, MIK, MBK ve %İnhibisyon değeri

| Kültürler                                | MIK               | MBK               | %İnhibisyon | Antimikrobiyal Zonları (mm)* |
|--|-------------------|-------------------|-------------|------------------------------|
| <i>Listeria innocua</i>                  | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %59,9       | 12±0                         |
| <i>Enterobacter cloacea</i>              | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %68         | 9±1                          |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>              | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %76,9       | 10,5±0,5                     |
| <i>Streptococcus lactis</i>              | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %67,7       | 11±0                         |
| <i>Bacillus coagulans</i>                | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %47,8       | 9±1                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %60,7       | 11,5±0,5                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %67,2       | 11,5±0,5                     |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698      | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %71,7       | 10±1                         |
| <i>Esheria coli</i> ATCC 25922           | %50<br>(500µg/mL) | %50<br>(500µg/mL) | %68,2       | 10,5±0,5                     |

\*Ortalama Değer±Standart Sapma

Çizelge 4.18'de görüldüğü üzere Boraks maddesi EGCG'nin etki değerini azaltma eğilimi göstermektedir; fakat bu değer diğer maddelere oranla az olduğu inhibisyon zonları çaplarından anlaşılmaktadır. Bazı mikroorganizmaların (*Listeria innocua*-1, *Streptococcus bovis*-27, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Esheria coli* ATCC 25922) MBK değerleri %25'den %50'ye çıkmış; diğerlerinin ise aynı kalmıştır (%50). EGCG maddesinin tek başına ekstraktı kullanılarak elde edilen yüzde inhibisyon değerleri EGCG ve boraks'ın

karışımına oran ile daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte boraks maddesinin EGCG maddesinin etkisi üzerine antagonistik etkisi diğer doğal maddelerden daha azdır.

EGCG ve boraks karışımının en güçlü inhibisyon etkisinin *Pseudomonas stutzeri* üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. İkinci en yüksek inhibisyon değeri *Micrococcus luteus* ATCC 4698 üzerinde gerçekleşirken; en düşük inhibisyon değeri üretim hatlarında %47,8 ile *Bacillus coagulans* üzerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Her üç üretim hattında da çok fazla yayılmış olduğu gözlemlenen ve sporlu bir bakteri türü olması nedeniyle temizliği oldukça zor olan *Bacillus* spp. üzerine mikropilaka ortamında bu oranda inhibisyon özelliği EGCG'nin tek başına uygulandığı durumdan çok fazla düşük olmadığı tespit edilmiştir (%53,2).

Lade ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada curcumin ve EGCG'nin eşit oranda karışımının su arıtma sistemlerinden izole edilmiş olan Gram negatif *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada curcumin ve EGCG'nin DMSO ile hazırlanan ekstraktlarının eşit oranda karıştırılması ile *Enterobacteriaceae* ailesinden olan mikroorganizmalar üzerine genel olarak etkili değerinin MİK miktarı 250 µg/mL olarak tespit edilmiştir. *Pseudomonas japonica* üzerine etkili MİK değeri ise 200 µg/mL olarak tespit edilmiştir. İlgili karışımın biyofilm inhibisyonu üzerine etkisi ise *Enterobacteriaceae* ailesinden olan mikroorganizmalar üzerine ortalama % 98 olarak tespit edilirken; *Pseudomonas japonica* üzerine % 97 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler çalışmamızda elde edilen değerlerden oldukça yüksektir. Curcumin'in dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan ekstraktının EGCG'nin DMSO ile hazırlanan ekstraktı üzerine bir sinerjistik etkisi görülmektedir. Çalışmamızda ise durum oldukça farklıdır. Çalışmada ekstraktlar insan sağlığı üzerine olumsuz etkisi olmayan ve gıda sanayinde kullanılan dezenfektanların bileşiminde de bulunan %70'lik etil alkol ile hazırlanmıştır. Etil alkol ile hazırlanan curcumin ekstraktı Ezine peyniri üretim hatlarından izole edilen Gram pozitif ve negatif izolatlar üzerine antimikrobiyal etkili olarak tespit edilememiştir. Üstelik curcumin yüzeyleri oldukça boyayan bir yapıya sahiptir. Bu durum Lade ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada 150 mg/L curcumin 3 L'lik bioreaktöre konulmuştur. Curcuminin bioreaktör içindeki membran modülü boyadığı çalışmada belirtilmiştir Gıda sanayinde dezenfeksiyon sonrası su ile durulama aşaması olmasına rağmen curcumin maddesinin yağda çözünür bir madde olması sebebiyle su ile tamamen yüzeylerden uzaklaştırılamaması ve süt gibi yağlı bir hammadde içerisine karışma olasılığı bulunmaktadır.

#### 4.3.2. Yeni Dezenfektan Madde Geliştirme Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında etkili bulunan kombinasyonun doğal maddeleri olan EGCG ve Boraks ekstraktları ile eşit miktarda karışımlarının kullanıldığı yeni formülasyonların mikroorganizmalar üzerine yüzde inhibisyon miktarları araştırılmıştır. Çalışma sırasında dezenfektan olarak kullanılacak doğal maddelerin üretim hattında çok iyi sirküle olarak dolaşabilmesi ve CIP-COP temizlik prosedürlerine kolay adapte olarak kullanılabilmesi için sıvı maddelerin EGCG-Boraks kombinasyonu ile karıştırılarak etki arttırımı olabileceği ön görülmüştür.

Vaara (1999) tarafından yapılan bir çalışmada EDTA güvenli ve ekonomik, metal çelatlari oluşturabilen bir madde olduğundan bahsetmiş; özellikle Gram negatif bakterilerin protein ve lipopolisakkarit yapıları ile etkileşime girebildiğini bildirmiştir. Helander ve ark. (1997) ve Walsh ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmalarda EDTA'nın özellikle Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapılarını bozarak bakteri hücrelerini hassaslaştırdığını bildirmişlerdir. Sevens ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada ise nisin ile EDTA kombinasyonunun *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium* üzerinde güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir (Sivarooban ve ark., 2008).

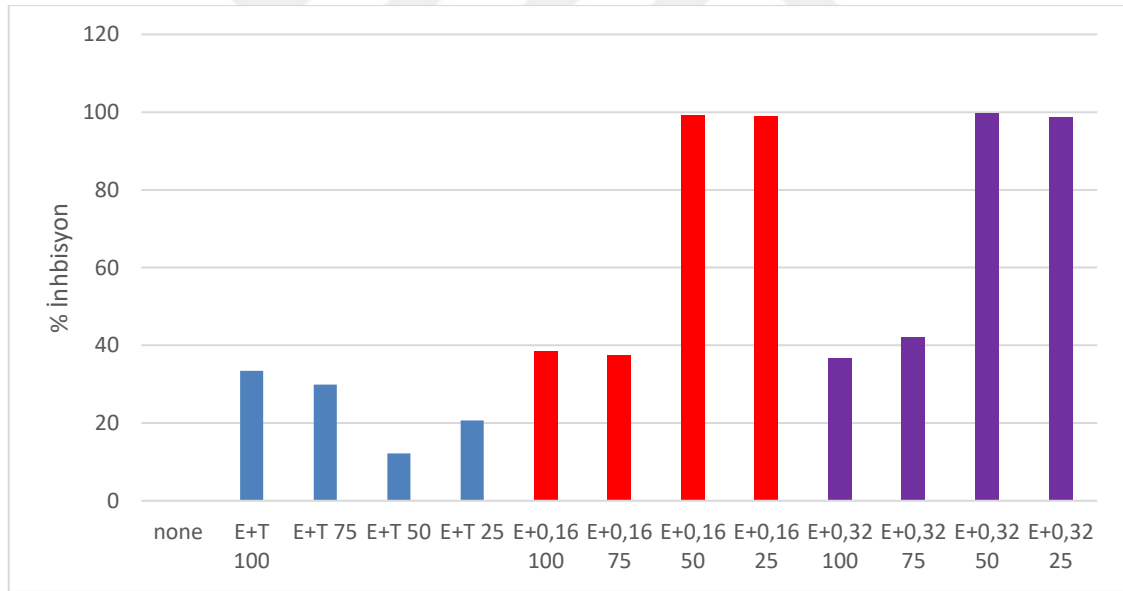
Sivarooban ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı (%1), nisin (10,000 IU/g) ve EDTA (%0,16)'nın ve bu üç maddenin kombinasyonunun *Escherichia coli*O157:H7, *Salmonella Typhimurium* ile *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi araştırılmıştır. 6 logkob/g olarak inoküle edilen *L. monocytogenes* sayısı sadece üzüm çekirdeği ekstraktı kullanıldığında 5,6 logkob/g'a; nisin kullanıldığında 4,9 logkob/g'a ve EDTA kullanıldığında 5,9 logkob/g'a düşmektedir. Çalışmada EDTA'nın diğer maddeler ile kombinasyonu ve üç maddenin birlikte kombinasyonlarının mikroorganizmalar üzerine daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Güçbilmez ve ark. (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise yine Gram pozitif bir tür olan ve çalışmamızda da hatlarda çok yaygın olarak izole edilen *Bacillus spp.*'e ait *Bacillus subtilis* üzerine disodium EDTA'nın güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

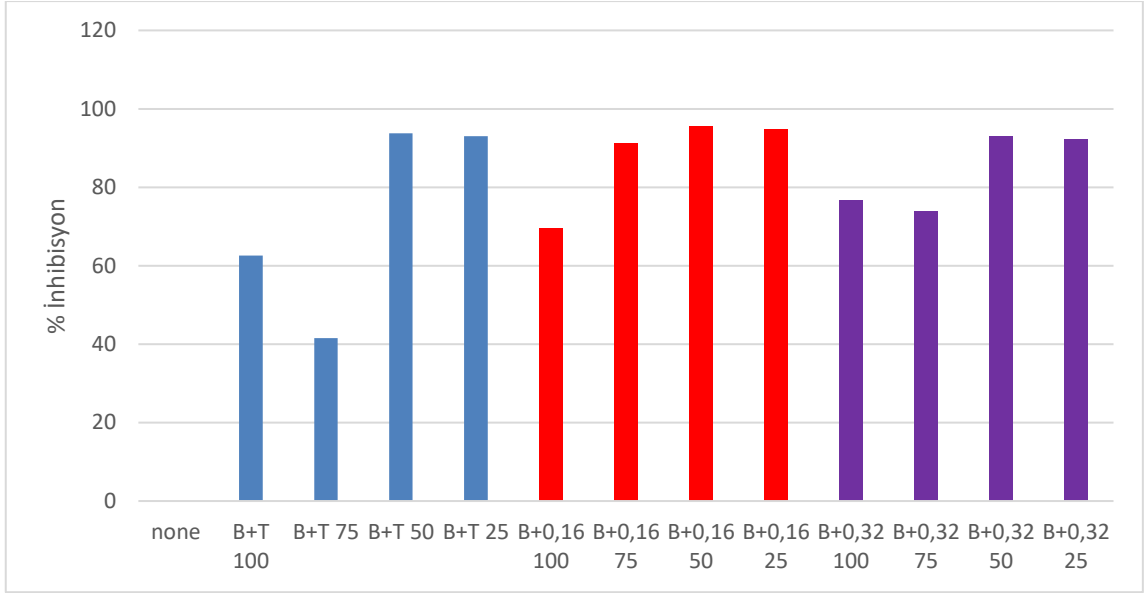
Kurita ve Koike (1982) tarafından yapılan bir çalışmada %7 NaCl'nin üstünde tuz oranının doğal antimikrobiyal maddelerin etkinliği üzerine antagonistik etkisi olduğu savunulmuştur. Huang ve ark. (1992) tarafından yapılan bir başka çalışmada antimikrobiyal maddelere dirençli Gram negatif ve pozitif bakteriler üzerine tuz solüsyonunda çözüldürülmüş antibiyotik maddeler uygulanmıştır. Çalışmada sonuç olarak en fazla %2 NaCl içeren solüsyon ile karıştırılan antibiyotik maddelerin mikroorganizmalar üzerine

etkili olduğu bulunmuştur. Bidlas ve Lambert (2008) yaptıkları çalışmada iki farklı tuz türü olan NaCl ile KCl'nin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Yapılmış olan çalışmada her iki tür tuz türünün de *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* ve *Staphylococcus aureus* üzerine antimikrobiyal etkisi olduğu görülmüş; KCl'nin NaCl'ye oranla daha etkili olduğu savunulmuştur.

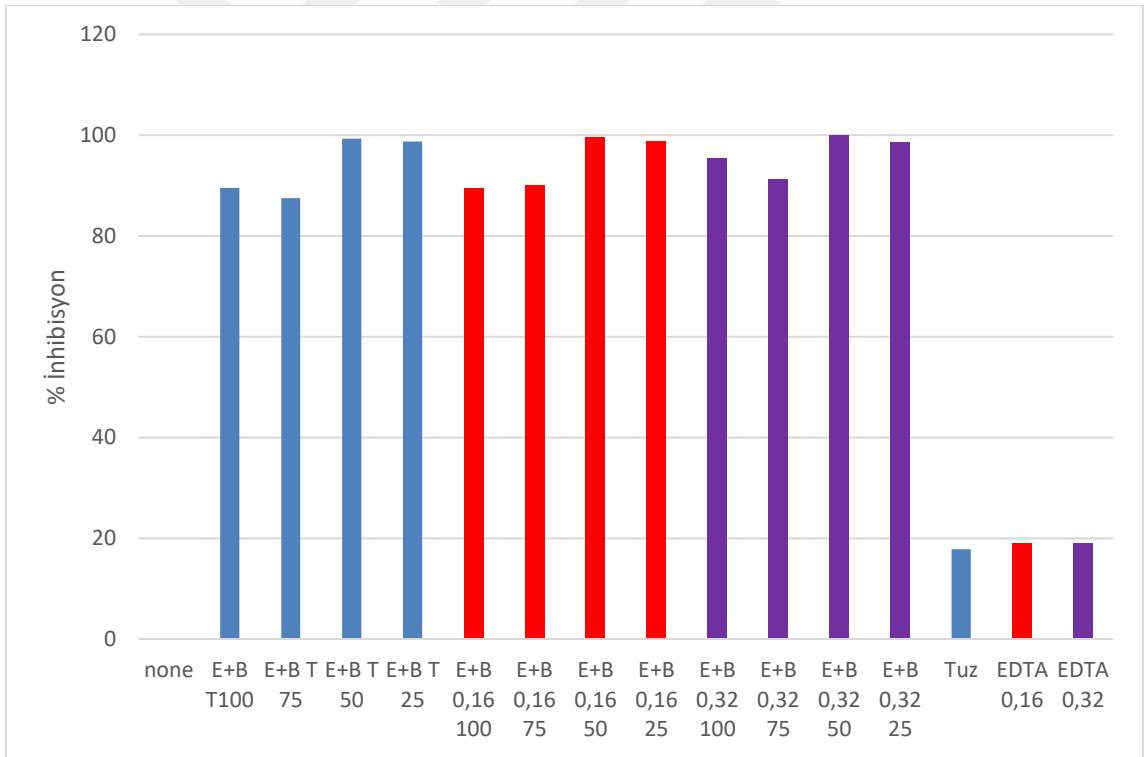
NaCl ve EDTA'nın EGCG, boraks ekstraktları ve bu ekstraktların kombinasyonu ile hazırlanacak olan yeni dezenfektan formülü içerisinde kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmada NaCl'nin %1'lik solüsyonu, EDTA'nın ise %0,32 ve %0,16'luk solüsyonları kullanılmıştır (Şekil 4.15, 4.16, 4.17 ve Çizelge 4.19). Yeni dezenfektan formüllerinin yüzde inhibisyon etkisinin araştırılması çalışmasında mikroorganizma olarak üretim hatlarında oldukça yaygın olarak izole edilen 32 nolu *Bacillus coagulans* kullanılmıştır. Sporlu bir bakteri türü olan *B.coagulans*, en etkili doğal madde kombinasyonu olan EGCG ve boraks kombinasyonun yüzde inhibisyon değerinin en az tespit edildiği izolat olması nedeniyle de seçilmiştir.



Şekil 4.15. E(EGCG) ile T(Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri



Şekil 4.16. B (Boraks) ile T (Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri



Şekil 4.17. E (EGCG), B (Boraks) ile T (Tuz-NaCl), 0,16-0,32 (%EDTA), 25-75-50-100 karışım oranlarını yüzde inhibisyon değerleri

Çizelge 4.19. EGCG ve Boraks 1 kombinasyonun% 1 NaCl, %0,16 EDTA ve %0,32 EDTA solüsyonları ile farklı oranlarda karışımlarının % İnhibisyon değerleri

| Madde  | Kombinasyon Maddesi | Karışma Oranı | % İnhibisyon |
|--------|---------------------|---------------|--------------|
| EGCG   | %1 NaCl             | 100:0         | %33,4        |
| EGCG   | %1 NaCl             | 75:25         | % 29,8       |
| EGCG   | %1 NaCl             | 50:50         | % 12,2       |
| EGCG   | %1 NaCl             | 25:75         | % 20,7       |
| EGCG   | %0,16 EDTA          | 100:0         | %38,4        |
| EGCG   | %0,16 EDTA          | 75:25         | % 37,4       |
| EGCG   | %0,16 EDTA          | 50:50         | % 99,3       |
| EGCG   | %0,16 EDTA          | 25:75         | % 99,0       |
| EGCG   | %0,32 EDTA          | 100:0         | %36,7        |
| EGCG   | %0,32 EDTA          | 75:25         | % 42,1       |
| EGCG   | %0,32 EDTA          | 50:50         | % 93,8       |
| EGCG   | %0,32 EDTA          | 25:75         | % 99,0       |
| Boraks | %1 NaCl             | 100:0         | %62,6        |
| Boraks | %1 NaCl             | 75:25         | % 41,5       |
| Boraks | %1 NaCl             | 50:50         | % 93,8       |
| Boraks | %1 NaCl             | 25:75         | % 93,0       |
| Boraks | %0,16 EDTA          | 100:0         | %69,4        |
| Boraks | %0,16 EDTA          | 75:25         | % 91,0       |
| Boraks | %0,16 EDTA          | 50:50         | % 95,6       |
| Boraks | %0,16 EDTA          | 25:75         | % 94,7       |
| Boraks | %0,32 EDTA          | 100:0         | %76,6        |
| Boraks | %0,32 EDTA          | 75:25         | % 73,9       |
| Boraks | %0,32 EDTA          | 50:50         | % 92,9       |
| Boraks | %0,32 EDTA          | 25:75         | % 92,2       |
| none   | %1 NaCl             | -             | % 17,8       |
| none   | %0,16 EDTA          | -             | % 18,9       |
| none   | % 0,32 EDTA         | -             | % 19,0       |



Çizelge 4.19.'un Devamı

|               |             |       |         |
|---------------|-------------|-------|---------|
| EGCG + Boraks | %1 NaCl     | 100:0 | % 89,5  |
| EGCG + Boraks | %1 NaCl     | 75:25 | % 87,5  |
| EGCG + Boraks | %1 NaCl     | 50:50 | % 99,   |
| EGCG + Boraks | %1 NaCl     | 25:75 | % 98,7  |
| EGCG + Boraks | %0,16 EDTA  | 100:0 | % 89,   |
| EGCG + Boraks | %0,16 EDTA  | 75:25 | % 89,9  |
| EGCG + Boraks | %0,16 EDTA  | 50:50 | % 99,57 |
| EGCG + Boraks | %0,16 EDTA  | 25:75 | % 98,7  |
| EGCG + Boraks | %0,32 EDTA  | 100:0 | % 95,46 |
| EGCG + Boraks | %0,32 EDTA  | 75:25 | % 91,2  |
| EGCG + Boraks | %0,32 EDTA  | 50:50 | % 100   |
| EGCG + Boraks | %0,32 EDTA  | 25:75 | % 98,58 |
| none          | %1 NaCl     | -     | % 17,8  |
| none          | %0,16 EDTA  | -     | % 18,9  |
| none          | % 0,32 EDTA | -     | % 19,0  |

Çizelge 4.19 ve Şekil 4.15, 4.16, 4.17'de görüldüğü gibi en yüksek yüzde inhibisyon değerlerine EGCG ile boraks ekstraktlarının eşit oranda karışımının yine eşit oranda %0,16 ile %0,32 EDTA ile kombinasyonu sonucu ulaşılmıştır. En düşük inhibisyon değeri ise EGCG ekstraktı ile %1'lik NaCl solüsyonlarının eşit oranında karıştırıldığı yöntem ile elde edildiği belirlenmiştir (%12,2). Günümüzde kullanılan dezenfektan maddelere oranla daha düşük maliyetle dezenfektan üretiminin hedeflenmesi durumunda boraksın %0,16'lık EDTA solüsyonu ile karışımının *B.coagulans* üzerinde % 95,6 oranında inhibisyon etkisine sahip olduğu da gözönüne alınmıştır.

Çizelge 4.19 ve Şekil 4.15, 4.16, 4.17'de görüleceği gibi tuz ve EDTA solüsyonları ön görüldüğü üzere EGCG, boraks ve EGCG ile boraks kombinasyonun yüzde inhibisyon değerlerini oldukça arttırmıştır. Sivarooban ve ark. (2008) üzüm çekirdeği ekstraktı, nisin, EDTA ve bu üç maddenin kombinasyonun Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Çalışmada içinde EDTA'nı olduğu kombinasyonların bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı durum Gram negatif bakterilerin sayıları için de görülmüştür. Çalışmamızda da benzer olarak EDTA doğal maddeler ile sinerjistik etki göstererek yüzde inhibisyon değerlerini yükseltmiştir. Güçbilmez ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışma sonucunda EDTA'nın

*Bacillus* spp. üzerine güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu bulunmuştur. Bu durum çalışmamızda EDTA'nın doğal maddelerin *B.coagulans* üzerine etkisinin artışı açıklamaktadır.

Boziaris ve ark. (2007) ise NaCl ve KCl tuzlarının *Listeria monocytogenes* üzerine eşit oranda etkili olduğu bildirirken (Bidlas ve ark., 2008); Wijnker ve ark. (2006) ise NaCl'nin antimikrobiyal etkisinin Gram negatifler üzerine Gram pozitiflere oranla daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda NaCl ve kombinasyon karışımlarının Gram pozitif bir bakteri olan *B.coagulans* üzerinde etkisinin EDTA'lı karışımlar kadar etkili olmayışını açıklamaktadır.

Çalışmada üretim hattında tuz bırakma olasılığı ve bu olasılığın ürünü etkileyebilme durumu nedeniyle %1 NaCl, %0,16 EDTA ve %0,32 EDTA kullanılmıştır. Seçilen oranlar yapılan literatür çalışmalarında belirlendiği üzere antimikrobiyal maddelere ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

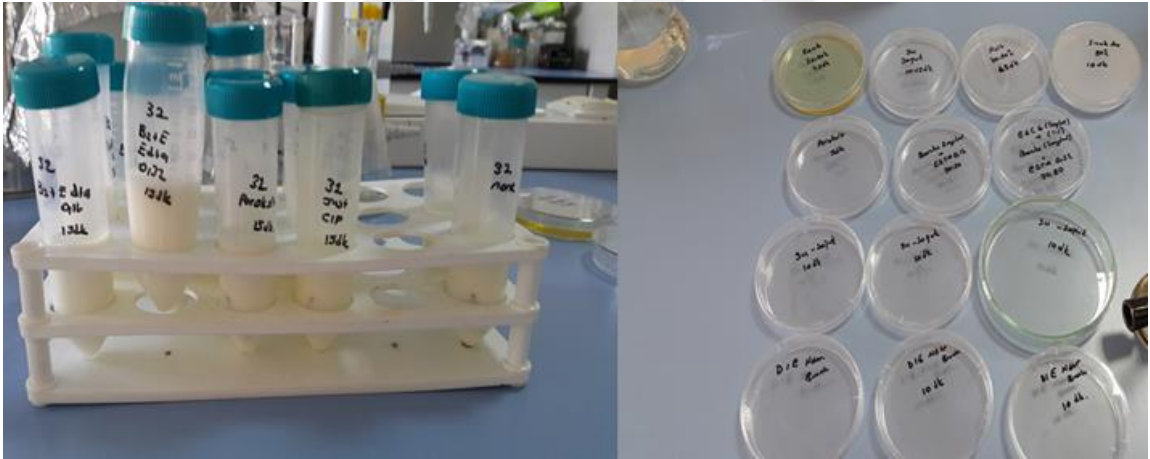
Yeni dezenfektan formüllerinin *B.coagulans* üzerinde yüzde inhibisyon değerleri incelenerek çalışmanın daha sonraki aşamalarında kullanılacak formülasyonlar belirlenmiştir. EGCG ve boraksın eşit karışımının %0,32 oranında EDTA ile kombinasyonu, %100 inhibisyon oranı ile en etkili formül olduğu belirlenmiştir. Onu takip eden en yüksek inhibisyon etkisine sahip formülasyonun EGCG ve boraksın eşit karışımının %0,16 oranında EDTA ile kombinasyonun olduğu tespit edilmiştir (%99,57). Denemesi yapılan dezenfektan formülleri arasında daha ekonomik olmasının yanı sıra yüksek inhibisyon oranına sahip olan formülasyonun ise boraks ile %0,16 oranında EDTA karışımı olduğu görülmüştür (%95,6). Bu çalışmanın bir sonraki aşaması için en yüksek inhibisyon değerine sahip olan EGCG ve boraksın eşit karışımının %0,32 oranında EDTA ile kombinasyonu ile ekonomik oluşu yanı sıra yüksek inhibisyon etkisine sahip olduğu görülen boraks ile %0,16 oranında EDTA karışımının kullanılmasına karar verilmiştir.

#### **4.4. Antibiyofilm-Antiquorum Sensing Etkili Yeni Dezenfektan Formüllerinin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Dezenfektan Etkinliği ve Korozyon Oluşturma Durum Tespiti**

Çalışmanın bu bölümünde belirlenen yeni dezenfektan formüllerinin etkinliğinin belirlenebilmesi için gerçek UHT sütün ve gerçek bir CIP prosedürünün kullanıldığı *invitro* bir araştırma planlanmıştır. Korozyon tespiti için ise SEM-EDX analizleri yapılmıştır.

#### 4.4.1. Antibiyofilm- Antiquorum Sensing Etkili Yeni Kombinasyonların Çelik Plaka Yüzeylerinde Dezenfektan Etkinliği Analizi

Çalışmanın son aşamasında seçilen iki farklı dezenfektan formülasyonunun etkinliği gerçek ticari dezenfektana karşı araştırılması hedeflenmiştir. Bu noktada işletmelerde üretim yüzeylerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan çelik plaka yüzeyler kullanılarak *invitro* ortamda gerçek süt sıvısı (UHT süt) içerisinde yüzeylerinde biyofilm oluşumuna izin verilmiştir. Mikroorganizma olarak üretim hattında biyofilm üretim kapasitesi yüksek olan *Enterobacteriaceae* familyasından 6 nolu izolat *Enterobacter cloacea* ve her üç üretim hattında da oldukça yaygın olduğu tespit edilen 32 nolu izolat *Bacillus coagulans* kullanılmıştır. Üzerinde biyofilm geliştirilmiş çelik plakalar 316 L üzerine edilen Firma B'nin CIP prosedürü uygulanmıştır (70-80°C/45 dk. kostik, soğuk su 10-15 dk., 70-80°C/45 dk. nitrik asit, 90°C/10 dk. sıcak su).



Şekil 4.18. Çelik plakalar üzerinde 24 saatlik biyofilm oluşumu, CIP ve dezenfektanların uygulaması

Firma B üretim hattında dezenfektan olarak perasetik asit bazlı ticari dezenfektan kullanılmaktadır. Çalışma süresince tespit edilen iki farklı doğal dezenfektan madde ile birlikte ticari dezenfektan üzerinde 24 saatlik mikrobiyal yük bulunan çelik plakalara CIP uygulanması ardından 5 ve 15 dk süre ile uygulanmıştır (Şekil 4.18).

Uygulama öncesinde ve sonrasında çelik plaka yüzeylerinden elde edilen biyofilm oluşturan hücreler ile yüzeye bağlanmamış fakat yüzeyden uzaklaşmamış sesil hücrelerin sayısı Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. CIP ve dezenfektan uygulaması öncesi/sonrası çelik plakalar yüzeylerinden elde edilen sesil/biyofilm oluşturabilir hücre sayıları, n=6 (kob/cm<sup>2</sup>)

| Sesil Hücre                 |                      | Biyofilm Oluşturan Hücre    |                      |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>Enterobacter cloacea</i> |                      | <i>Enterobacter cloacea</i> |                      |
| Hiç Bir İşlem               | 2,24x10 <sup>6</sup> | Hiç Bir İşlem               | 2,18x10 <sup>6</sup> |
| Yapılmamış                  |                      | Yapılmamış                  |                      |
| Sadece CIP                  | 3,86x10 <sup>4</sup> | Sadece CIP                  | 2,89x10 <sup>4</sup> |
| Perasetik asit 5 dk.        | 4,3x10 <sup>1</sup>  | Perasetik asit 5 dk.        | 0,33x10 <sup>1</sup> |
| Perasetik asit 15 dk.       | 1,67x10 <sup>1</sup> | Perasetik asit 15 dk.       | < 10                 |
| B+EDTA0,16 5dk              | 1,67x10 <sup>1</sup> | B+EDTA0,16 5dk              | < 10                 |
| B+EDTA0,16 15dk             | < 10                 | B+EDTA0,16 15dk             | < 10                 |
| B+E+EDTA0,32 5dk            | < 10                 | B+E+EDTA0,32 5dk            | < 10                 |
| B+E+EDTA0,32 15dk           | < 10                 | B+E+EDTA0,32 15dk           | < 10                 |
| <i>Bacillus coagulans</i>   |                      | <i>Bacillus coagulans</i>   |                      |
| Hiç Bir İşlem               | 2,27x10 <sup>6</sup> | Hiç Bir İşlem               | 3,68x10 <sup>5</sup> |
| Yapılmamış                  |                      | Yapılmamış                  |                      |
| Sadece CIP                  | 1,08x10 <sup>5</sup> | Sadece CIP                  | 3,1x10 <sup>4</sup>  |
| Perasetik asit 5 dk.        | 3,58x10 <sup>2</sup> | Perasetik asit 5 dk.        | 2,03x10 <sup>2</sup> |
| Perasetik asit 15 dk.       | 5,33x10 <sup>1</sup> | Perasetik asit 15 dk.       | 3,3x10 <sup>1</sup>  |
| B+EDTA0,16 5dk              | 1,33x10 <sup>1</sup> | B+EDTA0,16 5dk              | < 10                 |
| B+EDTA0,16 15dk             | < 10                 | B+EDTA0,16 15dk             | < 10                 |
| B+E+EDTA0,32 5dk            | < 10                 | B+E+EDTA0,32 5dk            | < 10                 |
| B+E+EDTA0,32 15dk           | < 10                 | B+E+EDTA0,32 15dk           | < 10                 |

\*Boraks (B), EGCG (E)

Dufour ve ark. (2004), Ölmez (2006), Cabo ve ark. (2009), Valerino ve ark (2012) tarafından yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemlere uygun olarak çalışmada süte son hücre konsantrasyonu 10<sup>4-5</sup> kob/mL olacak şekilde izolatlar inoküle edilmiştir. 30 °C/24 saat inkübasyon yapılmasının ardından mikroorganizma hücre sayıları belirlenmiştir. Hiç işlem uygulanmamış çelik plaka yüzeylerinde *Enterobacter cloacea* için sesil hücre miktarı 6 logkob/cm<sup>2</sup> civarındayken; biyofilm oluşturan hücre miktarı da aynı seviyede gerçekleşmiştir. *Bacillus coagulans* için ise biyofilm oluşturan hücre miktarı 5 logkob/cm<sup>2</sup> civarında gerçekleşmiştir. Çelik plakalara CIP uygulaması yapıldığında mikroorganizma yükünün 1 logaritma azalış gösterdiği görülmüştür. Bu durum aynı firmanın üretim

hatalarında temizlik öncesi ve sonrası görülen sonuç ile birebir benzerlik göstermektedir. Perasetik asitin *Enterobacter cloacea* hücreleri üzerinde *Bacillus coagulans* hücrelerine oranla oldukça etkili olduğu görülmüştür. *Bacillus coagulans*'in biyofilm üreten hücreleri için 15 dk'lık uygulama bile sayının sifıra düşmesine yetmemiştir. Boraks ve EDTA %0,16 ile hazırlanan dezenfektan maddenin 5 dakikalık uygulaması *Enterobacter cloacea* ve *Bacillus coagulans*'in sesile hücre sayılarını 1 logkob/cm<sup>2</sup> civarında elde edilmesini sağlarken; 15 dakikalık uygulama hücre sayılarını tespit edilebilir seviyenin altına düşürebilmektedir. Boraks ve EDTA %0,16 karışımının 5 ve 15 dakikalık uygulanması biyofilm oluşturabilen mikroorganizma hücre sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürebilmiştir. Boraks-EGCG ile EDTA %0,32 karışımının 5 ve 15 dakikalık uygulaması sesile hücrelerle birlikte biyofilm oluşturabilen hücrelerin sayılarını tespit edilebilir seviyenin altına indirebilmektedir.

Paslanmaz çelik 316 L içerdiği molibden nedeniyle korozyona daha dayanıklıdır; fakat *Bacillus* spp. ve sporlarının, yine ısıya dirençli *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus aureus*'un paslanmaz çelik yüzeye rahatlıkla yapışabildiği bildirilmiştir. Buna sebep olarak yüzeyin pürüzlü yapısı, bakteri hücrelerinin son derece hidrofilik oluşu gösterilmiştir (Flint ve ark., 2000; Julien ve ark., 2002; Kruszewski ve ark., 2013). Husmark ve Rönner (1990) ve Israhelachivili (1991) tarafından yapılan çalışmalarda ise hidrofilik *Bacillus cereus* sporlarının hidrofolik cam yüzeyleri üzerine yapışma oranını taşıyıcı sıvının etkilediği belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında deiyonize suyun *Bacillus cereus* sporlarının cama yapışma oranını 15 kat arttırdığını; bunun yanı sıra etil alkolün kendi hidrofobitesi nedeniyle sporları da hidrofobik hale getirdiği ve yapışma oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir (Flint ve ark., 2000). Bu durum çalışmamızda dezenfektan madde ekstraktlarının etil alkol kullanılarak hazırlanmasının özellikle hatlarda yaygın bir kontaminasyona sahip *Bacillus* spp. için doğru bir seçim olduğunun bir göstergesidir. Araştırmamızda hazırlanan dezenfektan formülleri *Bacillus coagulans*'ın sesil ve biyofilm oluşturan hücre sayılarını belirlenebilir limitin altına düşürmüştür.

Gündüz ve Tuncel (2006) tarafından yapılan bir çalışmada dondurma üretim hattında çeşitli noktalara yerleştirilen çelik plakalar üzerinde 8 saat sonra en fazla 10<sup>3</sup>kob/cm<sup>2</sup> seviyesinde üreme gerçekleşirken; CIP uygulaması sonrasında mikrobiyal gelişmenin en fazla 10<sup>2</sup> kob/cm<sup>2</sup> seviyesinde görüldüğü bildirilmiştir. CIP uygulaması yapılmayan drenaj ve üretim giriş alanlarında bulunan paspaslarda ise temizlik işlemi sonrası en fazla 10<sup>1</sup>kob/cm<sup>2</sup> seviyesinde üreme gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Dufour ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada laboratuvar ölçekli süt üretim hattında başlangıç mikroorganizma konsantasyonu  $10^5$  kob/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kullanılan mikroorganizmalar *Bacillus flavothermus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Streptococcus thermophilus* karışık kültürü olarak ortama eklenmiştir. 24 saat sonunda yüzeylerde hiçbir işlem yapılmadığında  $5,3 \pm 0,05$  logkob/cm<sup>2</sup> düzeyinde mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. CIP uygulamasının mikroorganizma sayısında önemli bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir. CIP prosedüre ekstra NaOH ile yıkama eklendiğinde  $2,4 \pm 0,1$  logkob/cm<sup>2</sup>'lik bir azalma olduğu ekstra nitrik asit ile yıkama eklendiğinde mikroorganizma sayısında  $1,9 \pm 0,1$  logkob/cm<sup>2</sup> düzeyinde azalma olduğu çalışmacılar tarafından belirlenmiştir. Klor (200ppm) uygulanmasının mikroorganizma yükünde  $0,7 \pm 0,2$  logkob/cm<sup>2</sup>, lauricidin (100ppm)  $1,2$  logkob/cm<sup>2</sup>; nisin (500 ppm)  $1,2$  logkob/cm<sup>2</sup> ve LPS uygulamasının ise  $2,1$  logkob/cm<sup>2</sup> azalmaya sebep olduğu saptanmıştır.

Dosti ve ark. (2005) yapılan çalışmada ise 304 paslanmaz çelik plakalara 2 mL kadar başlangıç miktarı belli olmayan *Pseudomonas* spp. kültürleri inoküle edilmiştir. Sayım için hasarlı hücreleri geri kazanımını sağlayan BHI-agar + %0,2 yeast ekstrakt kullanılmıştır. Biyofilm oluşturan hücre sayısının incelendiği çalışmada; 24 saat sonucunda kontrol örneklerinde  $10^5$  kob/mL seviyesinde *P. fragi*,  $10^4$  kob/mL seviyesinde *P. putida*,  $10^5$  kob/mL seviyesinde *P. fluorescens* varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada klor ve ozon kullanımının biyofilm oluşturan hücre sayısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Klorun kullanımı sonucunda;  $10^1$  kob/cm<sup>2</sup> seviyesinde *P. fragi*,  $10^2$  kob/mL seviyesinde *P. putida*,  $10^2$  kob/mL seviyesinde *P. fluorescens* varlığı tespit edilmiştir. Ozon kullanımı ile  $10^1$  kob/mL seviyesinde *P. fragi*,  $10^1$  kob/mL seviyesinde *P. putida*,  $10^2$  kob/ml seviyesinde *P. fluorescens* varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada sesil bakteri hücre sayıları da araştırılmış ve ortam olarak UHT süt kullanılmıştır. UHT süt ortamına *Pseudomonas* spp. kültürleri yanı sıra *Enterobacter cloacea*, *Enterobacter aerogenes* ve *Bacillus licheniformis* inoküle edilmiştir. Çalışmada kontrol örneklerinde  $10^{7-8}$  kob/mL seviyesinde sesil hücre varlığı tespit edilmiştir. Ozon ile yapılan denemede *Pseudomonas* spp. sesil hücre sayılarını  $10^1$  kob/mL seviyesine düşerken; *Enterobacter* spp. sesil hücre sayılarını  $10^1$  ve 0 kob/mL seviyesine, *Bacillus* spp. sesil hücre sayılarını ise  $10^4$  kob/mL seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. 2 dk klor kullanımının ise *Pseudomonas* spp. sesil hücre sayılarını  $10^5$  kob/mL seviyesine düşerken; *Enterobacter* spp. sesil hücre sayılarını  $10^{5-6}$  kob/mL seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. *Bacillus* spp. sesil hücre sayılarını ise  $10^5$  kob/mL seviyesine düştüğü görülmüştür.

Ölmez (2006) tarafından yapılan ve süt endüstrisinde biyofilm oluşumunun ve ticari dezenfektanların etkinliğinin incelendiği çalışmada ise  $10^8$ - $10^9$  kob/mL seviyesinde

mikroorganizma başlangıç konsantrasyonu  $10^5$ - $10^6$  kob/mL olacak şekilde hazırlanmış broth ortamına inoküle edilmiştir. Denemelerde paslanmaz çelik 316 kullanılmış; fakat aynı çelik yüzeyler üzerine tutunmanın farklı olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada aynı çelik yüzeyden 7 adet seçilmiş aynı şartlar altında tutunma  $5,69$ - $8,55$  logkob/cm<sup>2</sup> arasında değişmiştir. Sonuç olarak çelik plakalar üzerine ortalama tutunan mikroorganizma sayısının  $6,5$  logkob/cm<sup>2</sup> ( $8,55$ - $5,69$ ) olduğu; ticari dezenfektanların uygulanması sonucunda elde edilen en düşük mikroorganizma sayısının  $2,865$  logkob/cm<sup>2</sup>, en yüksek mikroorganizma sayısının ise  $7,44$  logkob/cm<sup>2</sup> olduğu tespit edilmiştir.

Cabo ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise son konsantrasyon  $10^8$  cfu/mL seviyesinde *Staphylococcus aureus* CECT4459 içinde polistiren kuponlar bulunan Tyriptone Soy Broth'a inokülasyon yapılmış; dezenfektan maddelerin yüzeyde bulunan sesil ve biyofilm oluşturan hücreler üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Benzalkonium chloride (BAC), ozon ve nisinin sesil ve biyofilm hücreleri üzerine LD 90 (bakteri hücrelerin %90'nının öldüğü süre) değerleri belirlenmiştir. BAC kullanımı ile sesil hücreler üzerinde 20 dk'da, biyofilm hücreleri üzerinde 5 dk LD 90 değerlerinin elde edildiği görülmüştür. Ozon kullanımı ile sesil hücreler üzerinde 15 dk'da, biyofilm hücreleri üzerinde 10 dk da LD 90 değerleri elde edilmiştir. Nisin kullanımı ile ise sesil hücreler üzerinde 30 dk'da, biyofilm hücreleri üzerinde 120 dk'da LD 90 değerleri elde edilmiştir.

Valeriano ve ark (2012) de yaptıkları çalışmada Tyriptone Soya Broth besiyerinde mikroorganizma yükü  $10^8$  kob/L olacak şekilde *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 paslanmaz çelik 304 yüzeyler üzerine inoküle edilmiş; toplamda 240 saat sonra sonuç alınmıştır. Çalışmada kontrol olarak %0,85 lik NaCl kullanılmış çelik plakalardaki mikroorganizma sayısı 10 dk'da  $7,76$  logkob/cm<sup>2</sup>, 20 dk'da  $6,75$  logkob/cm<sup>2</sup> ve 40 dk'da  $5,18$  logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. *C. citratus* ve *M. piperita* isimli doğal maddelerin kullanımı ile ise çelik plakalardaki mikroorganizma yükü 10 dk'da  $3,56$  log kob/cm<sup>2</sup> ve  $3,7$ , 20 dk'da ve 40 dk'da ise  $<10$  logkob/cm<sup>2</sup> seviyesinde tespit edilmiştir.

Laird ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada bergamot ve portakal esansiyel yağının 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen doğal madde karışımının hastanelerden izole edilen vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'un biyofilm oluşumunun üzerine etkisi incelenmiştir. Maddelerin 316 L çelik yüzeyler üzerine 24 saatlik uygulaması sonucunda *E. faecalis*'in biyofilm oluşturan hücre sayısını  $1,5$  logaritmik değer, *S. aureus*'un biofim oluşturan hücre sayısının  $3$  logaritmik değer azaldığı tespit edilmiştir.

Kumari ve Sarkar (2014) tarafından yapılan çalışmada soğutma tanklarından izole edilen *Bacillus cereus* hücreleri üzerine CIP prosedürlerinin etkinliği incelenmiştir. Araştırmacılar soğutma tanklarında *B. cereus* hücre sayısının  $10^6$  kob/cm<sup>2</sup>'ye çıktığı belirlemiş ve *invitro* şartlarda aynı seviyede mikroorganizmayı çelik plakalar üzerine inoküle etmiştir. Çalışmada iki farklı CIP prosedürü kullanılmıştır. Referans prosedür olarak %1 NaOH 65°C/10dk-su çalkalama- %1 HNO<sub>3</sub> 65°C/10dk-su çalkalama kullanılırken; ikinci metot olarak %1,5 NaOH 65°C/30dk-su çalkalama- %1 HNO<sub>3</sub> 65°C/10dk-su çalkalama kullanılmıştır. 24 saatlik biyofilm tabakaları üzerine her iki CIP metodunda uygulanmış ve mikrobiyal yükün azalış miktarı incelenmiştir. Referans CIP'in kullanıldığı çalışmada uygulama öncesi hücre sayısı 5,33 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilirken; uygulama sonrası sayı 2,03 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. İkinci CIP metodu uygulamasında ise uygulama öncesi hücre sayısı 5,10 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilirken; uygulama sonrası sayı 4,77 logkob/cm<sup>2</sup>'ye düşmüştür.

Vazquez-Sanchez ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise *Staphylococcus aureus* son hücre konsantrasyonu  $7 \times 10^5$  kob/mL olacak şekilde içinde paslanmaz çelik 304 çelik plakalar bulunan Tyrptone Soya Broth besiyerinde inoküle edilerek 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra çelik plaka yüzeylerinde biyofilm yapan hücre sayısı 4 logkob/cm<sup>2</sup> olarak bulunurken sesil hücre sayısı 4-5 logkob/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. Çalışmada 200, 500 ve 800 mg/L seviyesinde klor uygulaması yapılmış ve biyofilm üreten mikroorganizma seviyesindeki azalış sırasıyla 3,84, 4,44 ve 5,51 logkob/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar ve çizelge 4.20'de verilen çalışmamızda elde edilen sonuçlar incelenecek olursa; paslanmaz çelik 316 L kupon yüzeylerinde tespit edilebilen sesil ve biyofilm oluşturabilen hücre sayılarının benzer olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan ticari dezenfektan madde perasetik asit ve tarafımızdan hazırlanan yeni dezenfektan formülleri sesil ve biyofilm oluşturan hücreler üzerine referans olarak belirtilen çalışmalarda bahsi geçen ticari dezenfektan (klor, Benzalkonium chloride, ozon, nisin ve lauricidin) yöntemlerine oranla daha etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda paslanmaz çelik 316 L plakalar üzerine Firma B'ye ait CIP prosedürü uygulandığında elde edilen sonuçlar yine *Bacillus* spp. CIP işlemi sonrası çelik plaka yüzeylerindeki yükünü araştırmış olan Kumari ve Sarkar (2014) tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında temizlik için başarılı olmadığı yorumu yapılabilir. Kumari ve Sarkar (2014) tarafından yapılan çalışmada süt ürünleri üretim hatlarında bulunan soğutma tanklarından izole edilen *Bacillus cereus*  $10^4$  kob/ml seviyesinde içinde paslanmaz çelik 304



plakalar bulunan yağsız süt ortamına inoküle edilmiştir. 4°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda çelik plaka yüzeylerine *B.cereus* sayısının araştırmacılar tarafından önerilen CIP prosedürün uygulanması sonucu hüce oluşturan hücre sayının 4,77 logaritmik değer azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise UHT süt içerisinde paslanmaz çelik 316 L üzerinde Firma B’ni CIP prosedürü uygulandığında 30°C’de 24 saat geliştirilen *B.coagulans*’ın biyofilm oluşturan hücre sayısında ancak 1 logaritmik değer azalma olduğu belirlenmiştir. Bu noktada çalışmamızda kullanılan izolatların üretim hatlarından izole edildiği, güçlü biyofilm oluşturucu mikroorganizmalar olduğu ve ilgili CIP prosedürlerine rağmen yüzeylere tutunduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Firma B’nin gerçek üretim hatlarından alınan değerler ile *invitro* ortamda yapılan çalışma karşılaştırılacak olursa; herhangi bir temizlik işlemi uygulanmadığında gerçek üretim hattı çelik yüzeylerinde  $10^3$  kob/100cm<sup>2</sup> seviyesinde mikrobiyal yük tespit edilirken *invitro* şartlarda *Enterobacter cloacea* için  $10^6$  kob/cm<sup>2</sup>, *Bacillus coagulans* için  $10^5$  kob/cm<sup>2</sup> seviyelerinde mikrobiyal yük tespit edilmiştir. Bu duruma gerçek üretim hattında sütün başlangıç aşamasındaki mikrobiyal yükünün bilinmemesi yanı sıra gerçek üretim hattında mikroorganizmaların karışık kültür halinde bulunması ve bu karışık kültür içinde birbirine antagonistik etki gösterebilen türlerin bulunması gerekçe olarak gösterilebilir. Bununla birlikte gerçek üretim hattında genel mikrobiyal yük temizlik sonrası 1 logaritmik değer azalış göstermektedir. *Enterobactericea* yükü çelik yüzeyler için 1-2 logaritmik değer, *Bacillus* spp. yükü yine çelik yüzeyler için 1->1 logaritmik değer azalış göstermiştir. *Invitro* çalışmada ise CIP uygulaması sonucunda çelik kuponlar üzerindeki *E.cloacea* yükü 2 logaritmik değer, *B.coagulans* yükü 1 logaritmik değer azalmıştır. Firma kullanılan perasetik asitin yüzeylere uygulanması sonucunda azalış her iki tür mikroorganizma için 3-6 logaritmik değer arasında gerçekteleşmiştir.

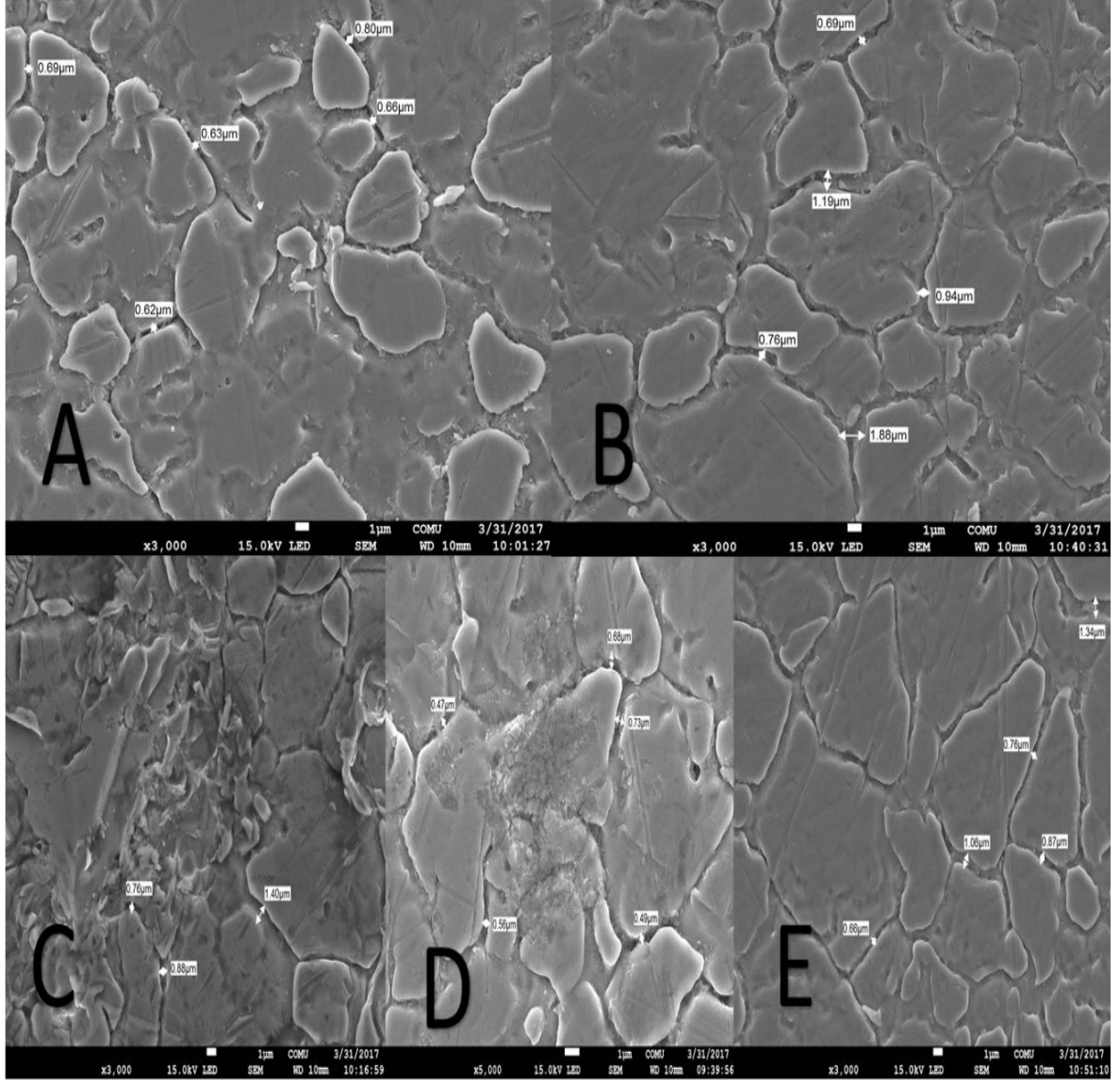
Perasedik asit toksik olmayan, bakterisidal, virusidal ve sporosidal bir dezenfektan madde olup; ortamda organik madde varlığı aktivitesini etkilememektedir. Ürün 0-50°C sıcaklık, pH 5,5-8,2 aralığında aktif olarak çalışmaktadır. Perasetik asit atık sularında klor gibi toksik yan ürünler (trihalometanlar ve haloasetik) maddeler oluşturmadığı; fakat atık sularının BOD ve COD değerlerini arttırdığı bildirilmiştir. Fakat son derece korozif olan dezenfektan madde, üzerinde biyofilm oluşmuş yüzeylerde serbest radikallerin oluşmasına neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda perasetik asitin düşük konsantrasyonlarda ( $\leq$  %1) kullanıma uygun olduğu bildirilirken; stabil bir ürün olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte perasetik asitin biyofilm içerisindeki kimyasal yapıları okside ederek; yapışmayı sağlayan yapıların ve kovalent bağların yüzeye iyice yapışmasına neden olduğu

bildirilmektedir. Su kullanımını ise perasetik asitin korozif etkisini azaltmak ile birlikte biyofilmler üzerine olumsuz etkisini arttırabilmektedir (Wirtanen ve ark., 2000; Wirtanen ve Salo, 2003; Kitis, 2003; Vural ve Çelen, 2005; Dell'Erba ve ark., 2007).

Gerçek üretim hattında perasetik asitin *invitro* şartlara oranla biyofilm oluşturan mikroorganizmalar üzerine sadece 1 logaritmik değer azalışa neden olabilmesi dezenfektanın gerçek üretim hattında doğru konsantrasyon, süre ve sıcaklıkta kullanılmaması yanı sıra CIP prosedüründe uygulanan su ile son durulama aşamasının süresine uyulmaması ve dezenfektan maddenin doğru bir şekilde depolanmaması olduğu düşünülmektedir.

#### **4.4.2. CIP, Ticari ve Doğal Dezenfektan Maddelerin Çelik Plaka Yüzeyleri Üzerine Korozyon Tespiti Analizi**

Çalışmanın son aşamasında antibiyofilm ve quorum quenching etkili iki yeni dezenfektan formülü ile referans işletmemiz (Firma B) tarafından kullanılan ticari dezenfektan maddenin yine Ezine peyniri üretim hatlarında kullanılan paslanmaz çelik 316 L üzerinde korozyona neden olabilme durumu araştırılmıştır.



Şekil 4.19. Paslanmaz çelik 316 L plakaların SEM görüntüleri (A Üzerine herhangi bir temizlik uygulanmamış pasif paslanmaz çelik 316 L yüzey, B Üzerine sadece CIP uygulanmış yüzey, C Üzerine CIP ve 5 dk. Perasetik asit uygulanmış yüzey, D Üzerine CIP ve 5 dk. Boraks-%0,16 EDTA uygulanmış yüzey, E Üzerine CIP ve 5 dk EGCG-Boraks-%0,32 EDTA uygulanmış yüzey)

Araştırma doğrultusunda Ezine peyniri üretimi yapan firmalarda yapıldığı gibi pasivizasyon yapılmış çelik plakalar üzerine tüm dezenfektanlar bir önceki çalışmada dezenfeksiyon için yeterli olduğu belirlenen 5 dk. süre ile uygulanmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen örnekler SEM-EDX analizine tabi tutularak korozyon oluşumunun gerçekleşme olasılığı incelenmiştir (Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21).

Şekil 4.19’da görülen A yüzeyi işlem görmemiş pasif çelik 316 L çelik plakanın yüzeyidir. Yüzeyde görülen kırıklar Ezine peyniri üreticilerinin de çelik yüzeylerine

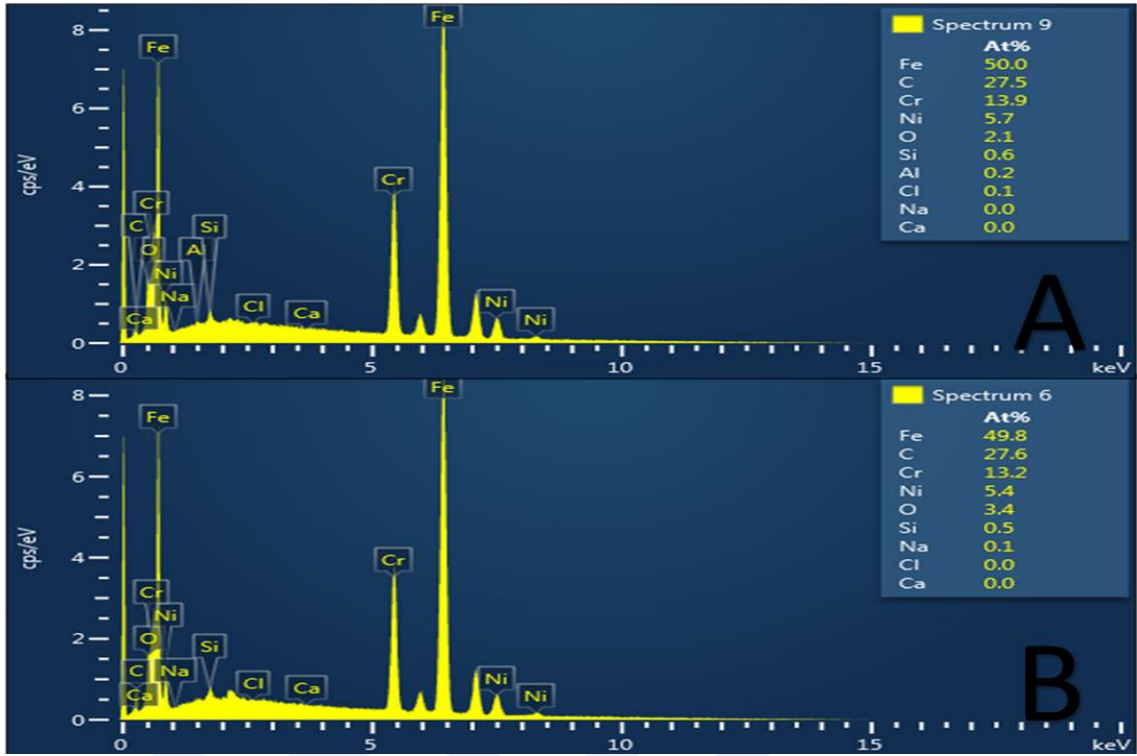
uyguladığı 1 N HCl ile pasivizasyon sonucu oluşmaktadır (Flint ve ark., 2000; Jullien ve ark., 2002; Faller ve ark., 2005; Yadav ve ark., 2011; Geng ve ark., 2015; Verma ve ark., 2017). Ahmad ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada korozyondan metallerin korunması için hidrofobitenin öneminden bahsetmektedir. Çalışmada hidrofobitesinin yüzeylerin tam olarak temizlenmesi ve korozyonun önlenmesi için çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Paslanmaz çelik 316 L hidrofobik ve pürüzlü bir yüzeye sahiptir.

Şekil 4.19’da pasif yüzeyde (A) asit nedeniyle oluşmuş delik şeklinde çukur korozyonlar görülmektedir. Sadece CIP uygulanmış yüzeyde (B) ise kırıkların genişlediği tespit edilirken; yüzeyde çukurcuk korozyon varlığı görülmüştür. Kırık genişlikleri çizelge 4.19’da görülebilir. CIP sonrası perasetik asitin uygulandığı örnek C’de ise kırık genişliği artmıştır. Yüzeyde çukurcuk korozyonun dışında parçalanma görülmektedir. CIP sonrası boraks ve %0,16 EDTA ile hazırlanan birinci formül paslanmaz çelik 316 L üzerine uygulandığında (D) kırık genişliği sadece CIP uygulanan yüzeyden daha azdır. Bu durum korozyon inhibisyonu konusunda olumlu görülmektedir. Bununla birlikte yüzeyde çukurcuk korozyon yanı sıra bazı deformasyonlar görülmektedir. Epicathechin gallat-boraks karışımı ile %0,32 EDTA ile hazırlanan ikinci formülün çelik plaka üzerine uygulanması (E) sonucu yüzeyde görülen kırık genişliği sadece CIP uygulanmış yüzeyde görülen kırık genişliğine oranla daha azdır. Yüzeyde herhangi bir çukurcuk korozyonu görülmezken; yüzeyde tüm örneklerde görülen asit çizgileri haricinde herhangi bir yapısal deformasyon görülmemiştir.

Çizelge 4.21. Paslanmaz çelik 316 L plakalarındaki kırık genişlikleri ( $\mu\text{m}$ )

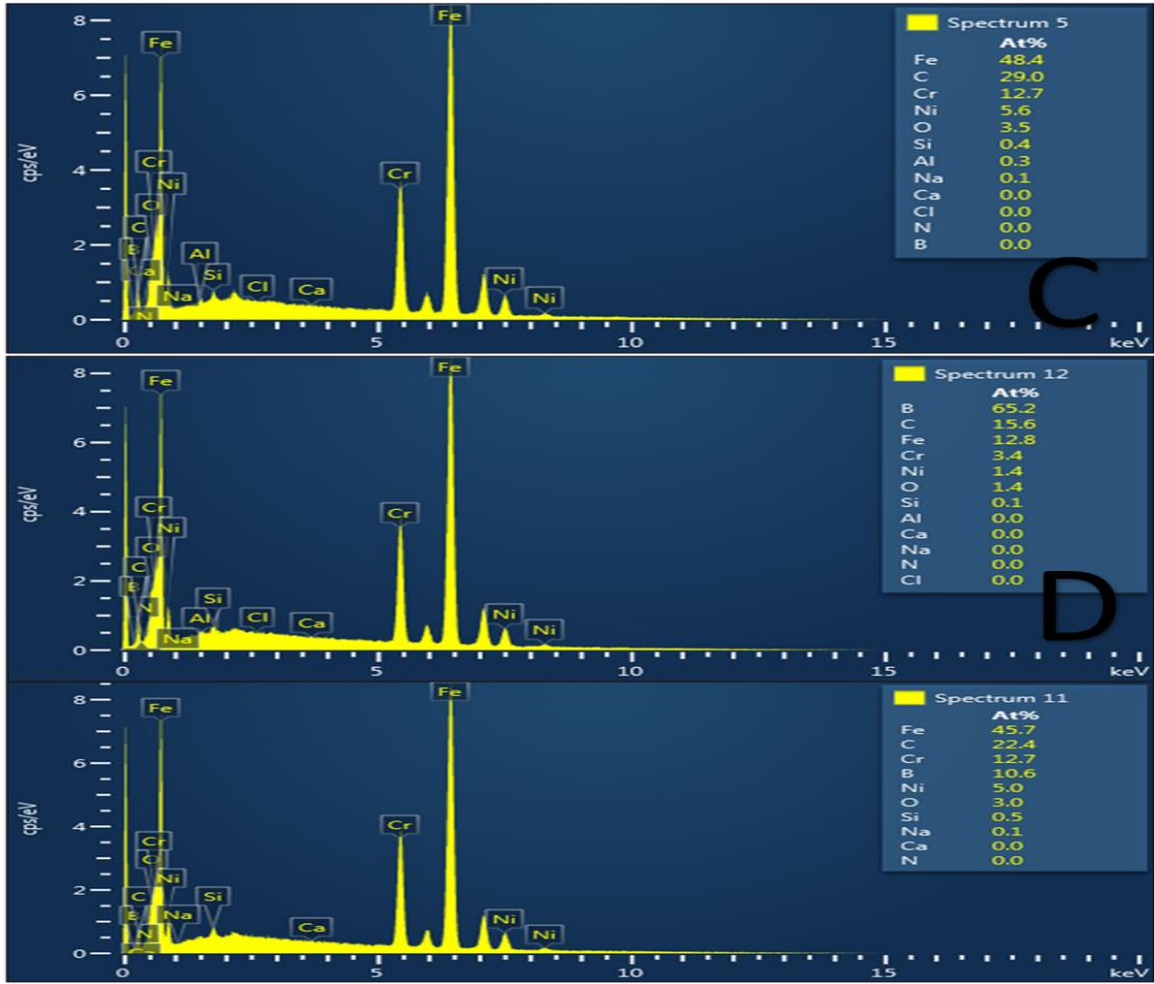
| Yüzey Türü   | Passivize Yüzey | CIP Uygulanmış Yüzey | CIP+5 dk. Perasetik Asit Uygulanmış Yüzey | CIP+ 5 dk. Boraks-%0,16 EDTA Uygulanmış Yüzey | CIP+ 5 dk. Boraks-EGCG-%0,32 EDTA Uygulanmış Yüzey |
|--------------|-----------------|----------------------|---|---|--|
| Ort $\pm$ SD | 0,68 $\pm$ 0,72 | 1,09 $\pm$ 0,48      | 1,18 $\pm$ 0,63                           | 0,59 $\pm$ 0,12                               | 0,94 $\pm$ 0,23                                    |

Süvari (2007) tarafından yapılan bir çalışmada *Herba hyperici* (farklı bir çeşit sarı kantaron) ve *Folium juglandis* (ceviz yaprağı) bitkilerinin yumuşak çeliğin korozyonu üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çalışmada doğal ekstraktlar 30 g/1L olarak saf su ile hazırlanmış ve farklı pH (4, 6, 8) değerlerindeki ortamlarda inhibitör etki değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmada *Folium juglandis* tüm pH değerlerinde çeliğin korozyonu üzerine inhibitör etkisi olduğu belirtilirken; *Herba hyperici*’nin pH 4 değerinde korozyonu hızlandırdığı görülmüştür. Aynı bitki pH 6 değerinde iyi bir inhibitör etki gösterirken; pH 8 değerinde orta düzeyde bir inhibitör etki göstermiştir.



Şekil 4.20. Paslanmaz çelik 316 L plakaların EDX analizi 1 (A üzerine herhangi bir temizlik uygulanmamış pasif paslanmaz çelik 316 Lyüzey, B Üzerine sadece CIP uygulanmış yüzey)

Elemental yüzey analiz çalışmasında paslanmaz çelik 316 L’de bulunan elementler yanı sıra pasivizasyon için kullanılan HCl, CIP prosedürü için kullanılan HNO<sub>3</sub> ve NaOH; perasetik asit ile muamele sonucu görülebilecek olan C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, boraks B (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) ve EGCG C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub> elementlerinin yüzeylerde bulunma durumu incelenmiştir.



Şekil 4.21. Paslanmaz çelik 16 plakaların EDX analizi 2 (C Üzerine CIP ve 5 dk. Perasetik asit uygulanmış yüzey, D Üzerine CIP ve 5 dk. Boraks-%0,16 EDTA uygulanmış yüzey, E Üzerine CIP ve 5 dk. EGCG-Boraks-%0,32 EDTA uygulanmış yüzey)

Çizelge 4.22. Paslanmaz çelik 316 L plakalarında EDX analizi element miktarları (%)

| Yüzey Türü | Fe   | C    | Cr   | Ni  | O   | Si  | Na  | Al  | Cl  | Ca  | B    | N   |
|------------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| A          | 50,0 | 27,5 | 13,9 | 5,7 | 2,1 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0  | 0,0 |
| B          | 49,8 | 27,6 | 13,2 | 5,4 | 3,4 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0  | 0,0 |
| C          | 48,4 | 29,0 | 12,7 | 5,6 | 3,5 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0  | 0,0 |
| D          | 12,8 | 15,6 | 3,4  | 1,4 | 1,4 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 65,2 | 0,0 |
| E          | 45,7 | 22,4 | 12,4 | 5,0 | 3,0 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 10,6 | 0,0 |

\*A Üzerine herhangi bir temizlik uygulanmamış pasif paslanmaz çelik 316 L yüzey, B Üzerine sadece CIP uygulanmış yüzey, C Üzerine CIP ve 5 dk. Perasetik asit uygulanmış yüzey, D Üzerine CIP ve 5 dk. Boraks-%0,16 EDTA uygulanmış yüzey, E Üzerine CIP ve 5 dk EGCG-Boraks-%0,32 EDTA uygulanmış yüzey

Pasifize edilmiş yüzey (A) ile CIP uygulanmış yüzeyde (B) elde edilen elementler karşılaştırıldığında arada önemli bir fark tespit edilememiştir. CIP uygulanmış yüzeyde pasifize yüzeyden farklı olarak %0,1 oranda kostik (NaOH) kaynaklı Na tespit edilmiştir. Kaynağın kostik olduğu kanısına paslanmaz çelik 316 L yapısında Na olmaması nedeniyle varılmıştır (Al-Saadi ve ark., 2016). Perasetik asit ile muamele edilen yüzey incelendiğinde ise yüzeyde Alümiyum elementine rastlanması çukurcuk korozyonun pasif yüzeyi geçerek paslanmaz yüzeye ulaştığına bir kanıttır. Galvele (1976) tarafından yapılan bir çalışmada çukurcuk korozyonun ilerlememesi durumunda Al iyonuna rastlanabileceğini belirtmiştir. Verma ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada paslanmaz çelik 316 L'nin ağırlığın %0,008'i kadar; Kumar ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise paslanmaz çelik 316'da ağırlığın %0,042'si kadar Al elementi olduğu belirtilmektedir. Ayrıca paslanmaz çelik 316 L üretiminde oksitlenmenin azalması için alüminyuma daldırma işlemi gerçekleştirilmektedir (Pasinli ve Köksal, 2009). Bu durum pasifize edilmiş, CIP uygulanmış ve perasetik asit 5 dk uygulanmış çelik plaka yüzeyinde Al iyonu görülmesini açıklamaktadır. Doğal maddelerden hazırlanmış ilk dezenfektan formülünün uygulandığı yüzeylerde (D ve E) Al iyonu görülmemesi korozyonun pasif yüzeyin altındaki tabakaya ulaşmadığının göstergesi olarak kabul edilebilir.

Analizlerde, 5 dk. boraks ve %0,16 EDTA formülü ile CIP sonrası muamele gören paslanmaz çelik 316 L örneği elemental analizinde diğer iyonların oranının düşmesi ve B iyonu oranının %65,2 olarak ölçülmesi, yüzeyde B kalıntısı olduğunu göstermektedir. Bor iyonu kalıntıları kırık aralarına yerleşebileceğinden; kırık genişliklerinin düşmesi bu şekilde açıklanabilir. Bor iyonu korozyon oluşumuna inhibitör etki gösterebilmektedir. Suvari (2007) tarafından yapılan çalışmada iki doğal maddenin yüzeyde korozyona inhibitör etki yarattığı belirlenmiştir. Bozorg ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada bakır plakalar 0,5 M sülfürik asit içine konulmuştur. Çalışmada inhibitör olarak %95 etil alkol ile hazırlanmış *Myrtus communis* (mersin bitkisi) 0, 50 ve 100 mg/L'lik ekstraktları kullanılmıştır. Yapılan araştırmada doğal ekstraktın bakır korozyonunu inhibe edebildiği belirtilirken; yüzeydeki kırık genişliğini çalışmamızda olduğu gibi azalttığı SEM analizi ile tespit edilmiştir. Ayrıca, Bozorg ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ekstrakt miktarının artışı ile yüzeyde düzleşme görülmüştür. Çalışmamızda boraks miktarının en yüksek olduğu 1:1 boraks+%0,16 EDTA formülü uygulanan yüzeyin ½'si kadar boraks bulunan boraks+EGCG+%0,32 EDTA formülü uygulanan yüzeye oranla kırık genişliğinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Fouada ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise paslanmaz çelik 316 L 1M HCl içine konulmuş ve üç adet organik maddenin asitin çelik

plaka üzerine korozyon etkisi üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan organik maddeler (E)-3-oxo-2-(m-toyldiazenyl) pentanenitrile (A), (E)-3-oxo-2-(phenyldiazenyl) pentanenitrile (B) ve (E)-3-(phenyldiazenyl) pentane -2,4-dione (c)'dir. Organik maddelerin distile su ile hazırlana ekstraktlarının asit korozyonu üzerine çeşitli molaritede etkileri araştırılıp koruma yüzdeleri hesaplanmıştır. En yüksek molarite değerinde ( $25 \times 10^{-6}$  M) A maddesinin yüzde koruma değeri % 76, B maddesinin % 69 ve C maddesinin % 61 olarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal ve quorum quenching etkisi en yüksek olan EGCG maddesi ve boraks ile üretilen ikinci dezenfektan formülü uygulanan yüzeylerin elemental analizinde diğer elementlerin yüzdeleri CIP uygulanmış yüzeye benzer bir yüzdeye sahipken; bor (B) elementi miktarı %10,6'dır. Yüzeyde herhangi bir deformasyon, yoğun ve büyük çukurcuk korozyona rastlanmamıştır. Kırık genişliği ise çizelge 4.21'de de görüleceği üzere CIP uygulanmış yüzeyden daha azdır. Formülün yüzey üzerine asit ve kostiğin etkisini inhibe edici bir özelliği olabileceği düşünülmüştür.

Üretiminin yaklaşık % 67'sinin ülkemiz tarafından gerçekleştirilen, doğal bir mineral olan boraksın birinci formül kullanıldığında daha yoğun olmak üzere yüzeyde kalıntı bırakması durumunun insan sağlığı açısından bir sorun teşkil edip etmeyeceği konusu literatürde araştırılmıştır. Boraks birinci formülde 500 µg/ml konsantrasyona sahipken; ikinci formülde 250 µg/ml konsantrasyona sahiptir. Birinci formülde yüzeyde %65,2 oranında, ikinci formülde %10,6 oranında Bor iyonu bulunmaktadır. Dezenfeksiyon işlemi sonrası su ile durulama işlemi yapılmadığında; kabaca birinci formül kullanımıyla yüzeyde 2,01 mg/cm<sup>2</sup>, ikinci formül kullanımıyla 0,16 mg/cm<sup>2</sup> borun yüzeyde kaldığı söylenebilir. Bor toprak, deniz ve havada doğal olarak var olan; içtiğimiz sularda, yediğimiz meyve, sebze ve kuru yemişlerde bulunan doğal bir mineraldir. En yüksek oranda kabuklu kuruyemişlerde bulunur. Örneğin fıstık da 13,8-18 µg/g, elmada 2,38-2,73 µg/g, kuru erikte 21,5-27 µg/g, çayda 1,03 µg/g, türk kahvesinde 14,33 µg/g'dır. Dünya Sağlık Örgütü WHO'ya göre içme sularında bor sınırı 0,1-0,3 mg/L olarak belirlenirken; Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi-EFSA ise bu sunırı 0,2-0,6 mg/gün olarak belirlemiştir. Dünya Sağlık Örgütü WHO'ya göre borun gıda ile alımı 1,2 mg/gün olarak belirlenmiştir (Demirtaş, 2000; Kuru ve Yarat, 2017). Fareler üzerinde yapılan toksidite testlerinde sınır, günlük 9,6 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Murray, 1995). Eti Maden işletmesi tarafından 2014'de yeniden düzenlenen "Eti Matik Bor Temizlik Ürünü" güvenlik bilgi formuna göre boraksın herhangi bir karsinojenik ve mutojenik etkisi tespit edilememiştir. Boraksın ortam havasında 15 mg/m<sup>3</sup> miktarında bulunabileceği bildirilirken; farelerde oral alım sonucu LD<sub>50</sub> değerinin 4500-6000 mg/kg



olduğu tespit edilmiştir. Doğada doğal olarak bulunan boraksın tatlı su kaynaklarında 1 mg B/L, içme sularında 0,5 mg/L ve toprakta 100-300 mg B/L arasında bulunması gerektiği vurgulanmıştır. Bu nedenlerle çevreye salınımının control altında yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda yzeyleerde görülebilen bor iyon değerleri günlük alım ve toksisite değerlerinin çok altındadır. Bor mineralinin işlendiği işletmeler de dahi atık arıtma sularının çevreyi tehdit etmediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Türker ve ark., 2014; An ve Xue, 2014; Erkmn ve Yapıcı, 2015; Kanan ve ark., 2015).



## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma dört bölüm halinde planmıştır. Çalışmanın birinci bölümünde Ezine yöresinde faaliyet gösteren üç farklı Ezine peyniri üreticisinin üretim hatlarında biyofilm oluşturan, iletişim sinyalleri (quorum sensing) olan bakteri florası tespit edilmiştir. İzole edilen Gram negatif bakterilerin, Gram negatif bakteriler için spesifik sinyal sistemi olan AHL sinyal varlığı araştırılırken; Gram pozitif izolatlar için genel sinyal sistemi olan AI-2 sinyal varlığı incelenmiştir.

İkinci çalışma kapsamında üretim alanlarından izole edilmiş olan biyofilm pozitif izolatlar üzerine etkili olabilecek doğal, antibiyofilm ve quorum quenching maddeler belirlenmeye çalışılmıştır.

Üçüncü çalışmada ise antimikrobiyal, antibiyofilm ve quorum quenching etkili olduğu belirlenen maddelerden dezenfektan formülasyonu bulunmaya çalışılmış; bu nedenle doğal maddelerin ikili, üçlü ve dördü kombinasyonlarının seçilen izolatlar üzerine antimikrobiyal etkisi ile birlikte % inhibisyon değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın son bölümünde ise, birinci çalışmada temizlik öncesi ve temizlik sonrası yüzey yükleri belirlenmiş olan Firma B'nin temizlik prosedürü kullanılarak; laboratuvar ortamında hazırlanan yeni dezenfektan formüllerinin sesil ve biyofilm oluşturan mikroorganizma yükünü azaltma miktarı, çelik plakaların korozyonuna katkıları konusunda tespitler yapılmıştır.

Çalışmanın birinci bölümünde Ezine peyniri üretiminin yaklaşık % 60'nı yapan üç üreticinin üretim hatları incelenmiş; koku problemine neden olabilecek bakteri türleri izole edilmiştir. **Her üç üretim hattında da *Bacillus spp.* yaygın bir şekilde olduğu tespit edilmiştir.** Firmaların konumları dolayısıyla çevrenin kuyu suyu kullanımının bu bakterinin kaynağı olduğu değerlendirilmiştir. Yine üretim hatlarında *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.* ve *Pseudomonas spp.* gibi kötü koku nedeni olabilecek bakteriler yanı sıra *Listeria spp.* gibi süt endüstrisinde ciddi problemlere sebep olan bakteriler izole edilmiştir. **Yapılan çalışma sırasında elde edilen tüm izolatların biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir.** Biyofilm üreticisi mikroorganizmalar arasında *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus thermophilus*, *S. bovis* ve *S. mitis* gibi önemli bakteri türleri yüzeylerden izole edilerek tanımlanmıştır. **Gram negatif izolatların hiçbiri kısa zincirli AHL üreticisi olmadığı;**

**Enterobacteriaceae**'ların %96,43'ünün uzun zincirli AHL üreticisi olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen Gram pozitif izolatların ise AI-2 sinyali üreticisi olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmalar tarafında biyofilm oluşumu için iki adet önemli faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin birincisi mikroorganizmaların genetik yapısıyken; ikincisi bakteriler arası iletişim sistemidir (O'Toole ve ark., 2000; Hammer ve Bassier, 2003; Reisner ve ark. 2006; Toyofuku ve ark., 2016). Mikroorganizmaların biyofilm yapısı içerisinde antibiyotik, dezenfektan gibi kimyasallara direnç kazandığı, direnç genlerini paylaştığı bilinmektedir (Mah ve O'Toole, 2003; Hammer ve Bassier, 2003). Mikroorganizmaların iletişimi quorum quenching etki ile kesilerek biyofilm oluşturmaları ve direnç paylaşımları engellenebilmektedir.

Çalışmamızda elde edilen izolatların biyofilm üreticisi olduğunun tespiti; Ezine peyniri üretim hatlarında biyofilm oluşumuna genetik yatkınlığı bulunan mikroorganizmaların var olduğunu bizlere işaret etmektedir. Gram negatif izolatlarımızdan *Pseudomonas* spp. olarak izole edilerek tanımlanan izolatlarımızın uzun veya kısa zincirli AHL üreticisi olmadığı indikatör bakteriler ile belirlenmiştir; fakat bu izolatların iletişim sistemi sahibi olmadığı söylenemez.

İlgili izolatların petri yöntemi ile tespit edilemeyen C14-HSL'den daha yüksek AHL sinyalleri ile iletişim kurabileceği gibi daha farklı sinyal sistemleri ile de iletişim kuruyor olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerle konunun daha ileri aşamalarda araştırılması gerekmektedir.

Üretim hattı yüzeylerinde biyofilm oluşturan bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılması için öncelikle antimikrobiyal doğal madde ekstraktların kullanımı çalışmamızda hedeflenmiştir. Bu nedenle 18 adet doğal materyalin %70 etil alkol kullanılarak ekstraktları hazırlanmıştır. **İzolatlar üzerine antimikrobiyal etkisi en yüksek olan maddenin EGCG olduğu tespit edilirken; ikinci sırada boraks vardır.** Çayın etken maddesi olan Epigallocatechin gallat'ın inhibisyon çaplarının diğer maddelere oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada boraksın biyofilm üreticisi olan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiş; inhibisyon çapları açısından ilgili maddenin ikinci sırada olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu yapabilen izolatlarımızın yine biyofilm oluşumu için önemli bir faktör olan quorum sensing sinyalleri üreticisi olduğu belirlenmiş ve doğal ekstraktların bu sinyaller üzerine quorum quenching etkisi araştırılmıştır. İlgili doğal maddelerden **Epigallocatechin gallat**'ın her iki sinyal türü (AHL ve AI-2) için de **QQ etkisinin** yüksek olduğu belirlenmiştir. **Boraksın AHL sinyalleri üzerine QQ etkisi AI-2 sinyalleri zerine olan etkisi kadar yüksek olmadığı**

**belirlenmiştir.** EGCG'nin AHL sinyalleri üzerine zon çapı ekstraktlar için de en yüksek iken; boraksın zon çapı ise EGCG ile elde edilen değerden oldukça düşüktür. AI-2 inhibisyon değeri açısından EGCG ekstraktı ile en yüksek inhibisyon değeri elde edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında ise antimikrobiyal-antibiyofilm ve quorum quenching etkili doğal madde ekstraktlarının kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri incelenmiş ve maddelerin birbiri üzerine antagonistik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Tek başına en etkili madde olan EGCG ile boraksın kombine edildiği çalışmada, EGCG üzerine boraksın antagonistik etkisinin diğer doğal ekstraktlara oranla oldukça düşük olduğu görülmüştür. **EGCG ile boraksın kombine edildiği çalışmada, EGCG üzerine boraksın antagonistik etkisinin diğer doğal ekstraktlara oranla oldukça düşük olduğu görülmüş; varlıklarında hazırlana dezenfektan formüllerinden biri %100 inhibisyon oranını sağlamıştır.**

Çalışmanın son basamağında ise Ezine peyniri üreticisi firmalarda kullanılan ve korozyon konusunda oldukça dirençli paslanmaz çelik 316 L üzerindeki korozyon etkileri ve yine paslanmaz çelik plakalar üzerinde geliştirilmiş 24 saatlik biyofilm tabakaları üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Çalışmada CIP prosedürü uygulanan firmanın kullandığı ticari dezenfektan madde perasetik asit de kullanılmıştır. CIP prosedürünün çelik plakalar üzerine korozif etkisinin olduğu tespit edilmiştir. **Çalışmamızda oluşturulan yeni dezenfektan formüllerinin 5 dk. uygulamasının sesil ve biofilm oluşturan hücre sayısını <10 kob/cm<sup>2</sup> seviyesine çekebildiği tespit edilmiştir.** Ticari dezenfektan madde olan perasetik asitin mikrobiyal yükü 5 dakikalık uygulama sonrası 5 logaritmik değer azaltabildiği görülürken; 5 dakikalık uygulamanın çelik plaka üzerine son derece korozif etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı maddenin 15 dakikalık uygulaması mikrobiyal yükü 6 logaritmik değere kadar azaltabilmektedir; fakat bu sürenin çelik plaka üzerine korozif etkiyi arttıracığı açıktır. Çalışmamızda kurgulanan doğal dezenfektan formülleri ise genel itibari ile 5 dakikalık uygulama sonucunda mikrobiyal yükü 6 logaritmik değer azaltmaktadır. Ek olarak, **doğal dezenfektan formüllerinin yüzeyler üzerine perasetik asit ve CIP'e oranla daha az korozif olduğu hatta yüzeylerin pürüzlülüğü üzerine olumlu etkiye sahip olduğu çalışma sırasında tespit edilmiştir.**

EGCG'nin 1 kg'ı 354 TL'dir (Anonim a, 2017). Boraks'ın 100 gr'ı 2,99 TL'dir (Anonim b, 2017). Kullanılacak olan doğal madde ekstraktının aynı zamanda çok pahalı olmaması, firmalar tarafından kolay kullanılması ve günümüzde kullanılan dezenfektan maddelere tercih edilebilir olması gerekmektedir. Çalışmamız sırasında temizlik prosedürü uygulanan firma B'nin üretim hattında kullandığı perasetik asit bazlı dezenfektanın ortalama

fiyatı 401,20 TL/20 L'dir (Anonim c, 2017). Fiyat olarak EGCG'nin tek başına kullanımının maliyeti arttırıcı olduğu tespit edilmiş; bu nedenle EGCG'nin boraks ile kombinasyonun ileriki aşamalarda kullanımı hedeflenmiştir. Verilen fiyatlar ile hesaplama yapıldığında EGCG ve boraksın kullanıldığı dezenfektan formülünün kabaca fiyatı 197 TL/20L olarak hesaplanmıştır. Dezenfektan formül gelişimi sırasında doğal maddelerin tüm üretim alanı/hattı yüzeylerine daha ucuz yollarla ulaşabilmesi ve doğal maddelerin etkilerini arttırıcı sıvı kullanımı tercih edilmiş; %0,32 ve %0,16 EDTA, %1NaCl kullanılmıştır. Yapılan çalışmada EGCG ve Boraks kombinasyonunun eşit oranda %0,32 EDTA'lı formül ile boraks-%0,16 EDTA'lı ikinci formülün biyofilm oluşturan mikroorganizmalar üzerine yüzde inhibisyon etkisinin %100 seviyesine kadar çıkabildiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız sırasında iki adet doğal madde tabanlı doğal dezenfektan formülü geliştirilmiştir. Bu dezenfektan formüllerinin 24 saatlik biyofilm tabakaları üzerinde inhibisyon etkileri ve paslanmaz çelik plakalar üzerine anti-korozif etkileri başarılı bulunmuştur.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu çalışma sırasında elde edilen doğal madde kombinasyonlarının AI-1 ve Gram pozitiflere özel AIP sistemleri gibi sinyal molekülleri üzerine QQ etkileri belirlenmelidir. Yeni iki formülün mikroorganizmaları hangi mekanizma ile antimikrobiyal-antibiyofilm, quorum quenching etkiyi oluşturduğu araştırılmalıdır. Bu yol ile DNA'nın parçalanmaması durumunda mikroorganizmaların yeni formüllere direnç kazanma durumun ortaya çıkabilme durumu değerlendirilmelidir. Ayrıca bu formüllerin kullanımının atık arıtma sistemlerinde arıtma maliyetlerine azaltabilme oranları ve çevreye olumsuz katkı durumları incelenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Abera D., Sisay T., Birhanu T., 2014. Isolation and identification of *Mannhemia* and *Pasturella* species from pneumonic and apparently healthy cattle and their antibiogram susceptibility pattern in Bedelle District, Western Ethiopia. African Journal of Bacteriology Research, 6(5), 32-41.
- Abolghait S. K., Garbaj A. M., Moawad A. A., 2011. Raw cow's milk relatively inhibits quorum sensing activity of *Cromobacterium violaceum* in comparison to raw she-camel's milk. Open Veterinary Journal, 1(1): 35-38.
- Aday M.S., Caner C., Karagül-Yüceer Y., 2010. Instrumental and Sensory Measurements Of Ezine Cheese Texture. Akademik Gıda. 8 (3): 6-10.
- Aday S., Karagül-Yüceer Y., 2008. Coğrafi İşaret ve Ezine Peyniri. Ezine Değerler Sempozyumu. 29-30 Ağustos. Çanakkale.
- Adukwu E.C., Allen S.C., Phillips C.A., 2012. The anti-biyofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology. 113 (5): 1217-1227.
- Ahmad Z., Khan A.U., Farooq R., Mastoi N.R., Saif T., 2015. Hydrophobicity-A Green Technique for Enhancing Corrosion Resistance of Alloys. New Trends in Alloy Development, Characterization and Application. InTech Press. 1st Ed., Chapter 7, 195-237s.
- Aiad A.S., 2013. Microbial Hazards Assessment During White Cheese Production In A Traditional Dairy Plant. Assiut Vet. Med. J. Vol. 59 No. 137 April 57-63
- Akan E., Yerlikaya O., Kımık Ö., 2011. Psikrotrof Bakterilerin Çiğ Süt ve Süt Ürünleri Kalitesine Etkisi. Akademik Gıda. 12 (4): 68-78
- Akdoğan Eker A., 2009. Bakım Mühendisliği Uygulamalarında Malzeme Biliminin Önemi. Mühendis ve Makine, 50 (598): 52-55.
- Akter K., Barnes E. C., Brophy J. J., Harrington D., Vemulpad S. R., Jamie J. F., 2016. Phytochemical Profile and Antibacterial and Antioxidant Activities of Medicinal

- Plants Used by Aboriginal People of New South Wales, Australia. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016: 1-14.
- Al-Dagal M., Fung D.Y.C., 1990. Aeromicrobiology A Review. Critical Review Food Science Nutrition. 29: 333-340.
- Ali A., Akhtar N., Bashir U., Hafeez R., Haider M. S., 2015. Morphological and biochemical characterization of bacteria isolated from milk products. Biologia (Pakistan), 61(2), 271-277.
- Almasoud A., Hettiarachchy N., Rayaprolu S., Babu D., Kwon Y.M., Mauromoustakos A., 2016. Inhibitory Effects Of Lactic And Malic Organic Acids On Autoinducer Type 2 (AI-2) Quorum Sensing of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium. LWT-Food Science and Technology. 66: 560-564.
- Almeida G., Magalhães R., Carneiro L., Santos I., Silva J., Ferreira V., Teixeira P., 2013. Foci Of Contamination Of *Listeria Monocytogenes* In Different Cheese Processing Plants. International Journal Of Food Microbiology. 167 (3): 303-309.
- Al Saadi S., Yi Y., Cho P., Jang C., Beeley P., 2016. Passivity Breakdown of 316L Stainless Steel During Potentiodynamic Polarization in NaCl Solution. Corrosion Science. 111: 720-727.
- Alsaggaf M. S., Moussa S. H., Tayel, A. A., 2017. Application of Fungal Chitosan Incorporated with Pomegranate Peel Extract As Edible Coating For Microbiological, Chemical And Sensorial Quality Enhancement Of Nile Tilapia Fillets. International Journal of Biological Macromolecules, 99: 499-505.
- Alvarez M. V., Moreira M. R., Ponce A., 2012. Antiquorum Sensing And Antimicrobial Activity Of Natural Agents With Potential Use in Food. Journal of Food Safety, 32(3), 379-387.
- Ammar S., Oturan M.A., Labiadh L., Guersalli A., Abdelhedi R., Oturan N., Brillas E., 2015. Degradation of Tyrosol by a Novel Electro-Fenton Process Using Pyrite as Heterogeneous Source of Iron Catalyst. Water research. 74: 77-87.
- An J., Xue X., 2014. Life Cycle Environmental Impact Assessment of Borax and Boric Acid Production in China. Journal of Cleaner Production. 66: 121-127.

- Andersson A., Rönner U., Granum P.E., 1995. What Problems Does the Food Industry Have with the Spore-Forming Pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. International journal of food microbiology. 28 (2): 145-155.
- Anonim, 2005. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. Sağlık Bakanlığı. Resmi Gazete, Sayı: 25730, 17.02.2005.
- Anonim, 2016. Firma B Ezine Peyniri Üretim Hattı. Kişisel Firma Ziyareti. 15 Eylül 2016.
- Anonim, 2017a. Epigallocatechin Gallate Fiyatı. 14 Temmuz 2017, [https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Organic-Matcha-Green-Tea\\_60227596682.html](https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Organic-Matcha-Green-Tea_60227596682.html).
- Anonim, 2017b. Boraks Fiyatı. 01 Haziran 2017, <http://magaza.hammaddeler.com/Zag-Boraks-Dekahidrat-Teknik-Tip-1-kg,PR-2886.html>.
- Anonim, 2017c. Perasetik Asit Bazlı Ticari Dezenfektan Fiyatı. 01 Haziran 2017, [http://mssgrup.com/index.php?route=product/product&product\\_id=603](http://mssgrup.com/index.php?route=product/product&product_id=603)
- AOAC, 2000. Official Methods Of Analysis Of AOAC International. (Volume I and II, 17th Ed.). Virginia: Association Of Official Analytical Chemists, Inc. Usa. 1094 P.
- Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Carvellatti M., Donati E., Montonaro L., 2002. Detection Of Slime Production By Means Of An Optimised Congo Red Agar Plate Test Based On Colorimetric Scale in *Staphylococcus Epidermidis*, Clinical Isolates Genotyped For Ica Locus. Biomaterials. 23: 4233-4239.
- Armstrong R.A., Hilton A.C., 2011. Statistical Analysis in Microbiology; Statnotest, Society for Applied Microbiology. New Jersey: Wiley-Blackwell Publication. USA
- Arnold J.W., Silvers S., 2000. Comparison Of Poultry Processing Equipment Surfaces For Susceptibility to Bacterial Attachment and Biofilm Formation. PoultryScience. 79 (8): 1215-1221.
- Aruliah R., Ting Y.P., 2014. Characterization of Corrosive Bacterial Consortia Isolated from Water in a Cooling Tower. ISRN Corrosion, 2014: 1-11.
- Atlas R.M., 2010. Handbook of Microbiological Media. CRC press. 2037 s.



- Ayçiçek H., Oguz U., Karci K., 2006. Comparison of Results of ATP Bioluminescence and Traditional Hygiene Swabbing Methods for the Determination of Surface Cleanliness at a Hospital Kitchen. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209 (2): 203-206.
- Avcı M.K., 2009. Quorum Sensing Odaklı Yenilikler ve Biyoteknolojik Uygulamalar. 01 Haziran 2017, <http://quorumsensing.net/dokumanlar>.
- Bai A.J., Vittal R.R., 2014. Quorum Sensing Inhibitory and Anti-biofilm activity of Essential Oils and their In Vivo Efficacy in Food Systems. *Food Biotechnology*. 28 (3): 269-292.
- Barancelli G.V., Camargo T.M., Gagliardi N.G., Porto E., Souza R.A., Campioni F., Falcao J.P., Hofer E., Cruz A.G., Oliveira C.A., 2014. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolate from Cheese Manufacturing Plants in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 173: 21-29.
- Barbosa L.P., Costa I., 2005. Evaluation of the Corrosion Resistance of AISI 316 Stainless Steel filters. *Materials Research*. 8(2), 165-168.
- Bassler B. L., 1999. How Bacteria Talk to Each Other: Regulation of Gene Expression by Quorum Sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6): 582-587.
- Bassler B. L., 2002. Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*, 109(4): 421-424.
- Bayoub K., Baibai T., Mountassif D., Retmane A., Soukri A., 2010. Antibacterial Activities of the Crude Ethanol Extracts of Medicinal Plants Against *Listeria monocytogenes* and Some Other Pathogenic Strains. *African Journal of Biotechnology*. 9 (27): 4251-4258.
- Beech I.B., Sunner J., 2004. Biocorrosion: Towards Understanding Interactions Between Biofilms and Metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 15 (3): 181-186.
- Bellon-Fontaine M.N., Mozes N., Van der Mei H.C., Sjollema J., Cerf O., Rouxhet P.G., Busscher H.J., 1990. A Comparison of Thermodynamic Approaches to Predict the Adhesion of Dairy Microorganisms to Solid Substrata. *Cell Biophysics*. 17 (1): 93.

- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001. Recent Advances in Cheese Microbiology. *International Dairy Journal*. 11 (4): 259-274.
- Bidlas E., Lambert R.J., 2008. Comparing the Antimicrobial Effectiveness of NaCl and KCl with a View to Salt/Sodium Replacement. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (1): 98-102.
- Bilgen Ö. B., Doğan N., 2017. Puanlayıcılar Arası Güvenirlik Belirleme Tekniklerinin Karşılaştırılması The Comparison of Interrater Reliability Estimating Techniques. *Journal of Measurement and Evaluation in Education and Psychology*,8(1): 63-78.
- Biomerieux, 2015. API 20 NE, API 20 E, API 50 CHB Tanımlama Kitleri Tanımlama Yardımcı Kitapçığı. RCS LYON, Marcy-l'Etoile, Fransa. 20 s.
- Biswa P., Doble M., 2013. Production of Acylated Homoserine Lactone by Gram-Positive Bacteria Isolated from Marine Water. *FEMS Microbiology Letters*. 343 (1): 34-41.
- Bore E., Langsrud S., 2005. Characterization of Micro-organisms Isolated from Dairy Industry After Cleaning and Fogging Disinfection with Alkyl Amine and Peracetic Acid. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (1): 96-105.
- Boziaris I.S., Skandamis P.N., Anastasiadi M., Nychas G.J., 2007. Effect of NaCl and KCl on Fate and Growth/No Growth Interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at Different pH and Nisin Concentrations. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (3): 796-805.
- Bozorg M., Shahrabi Farahani T., Neshati J., Chaghazardi Z., Mohammadi Ziarani G., 2014. *Myrtus Communis* as Green Inhibitor of Copper Corrosion in Sulfuric Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 53 (11): 4295-4303.
- Bryan J., Redden P., Traba C., 2016. The Mechanism of Action of Russian Propolis Ethanol Extracts Against two Antibiotic-Resistant Biofilm-Forming Bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 62 (2): 192-198.
- Bulman Z., Le P., Hudson A. O., Savka M. A., 2011. A Novel Property of Propolis (Bee Glue): Anti-Pathogenic Activity by Inhibition of N-Acyl-Homoserine Lactone Mediated Signaling in Bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*,138(3): 788-797.

- Burgess S. A., Lindsay D., Flint S. H., 2010. Thermophilic *Bacilli* and Their Importance in Dairy Processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 215-225.
- Burke N., O'dwyer J., Southern M., Adley C.C., 2017. An Analysis Of The Microbial Quality Of Water In A Milk Production Plant. *Lwt-Food Science And Technology*. 78: 41-46.
- Burt S., 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods-a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
- Cabo M.L., Herrera J.J., Crespo M.D., Pastoriza L., 2009. Comparison Among the Effectiveness of Ozone, Nisin and Benzalkonium Chloride for the Elimination of Planktonic Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on Polypropylene. *Food Control*. 20 (5): 521-525.
- Cais-Sokolin'ska D., Wójtowski J., Pikul J., Dobrzańska A., 2016. An Attempt at the Specification of Common Cleanliness Limits for Abiotic Surfaces in Dairy Processing Plants Based on ATP Bioluminescence. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 67: 12-16.
- Caixeta D.S., Scarpa T.H., Brugnera D.F., Freire D.O., Alves E., Abreu L.R.D., Piccoli R.H., 2012. Chemical Sanitizers to Control Biofilms Formed by Two *Pseudomonas* species on Stainless Steel surface. *Food Science and Technology (Campinas)*. 32 (1): 142-150.
- Caputo L., Quintieri L., Bianchi D.M., DecaSelli L., Monaci L., Visconti A., Baruzzi F., 2015. Pepsin-Digested Bovine Lactoferrin Prevents Mozzarella Cheese Blue Discoloration Caused By *Pseudomonas fluorescens*. *Food Microbiology*. 46: 15-24
- Carescosa C., Millán R., Jaber J.R., Lupiola P., Del Rosario-Quintana C., Mauricio C., Sanjuán E., 2015. Blue Pigment In Fresh Cheese Produced By *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*. 54: 95-102.
- Casani S., Rouhany M., Knöchel S., 2005. A Discussion Paper on Challenges and Limitations to Water Reuse and Hygiene in the Food Industry. *Water research*. 39 (6): 1134-1146.
- Chalova V. I., Crandall P. G., Ricke S. C., 2010. Microbial Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Cold-Pressed Terpeneless Valencia Orange (*Citrus*

- sinensis*) Oil in Different Dispersing Agents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(5): 870-876.
- Chang C. Y., Krishnan T., Wang H., Chen Y., Yin W. F., Chong Y. M., Chan K. G., 2014. Non-Antibiotic Quorum Sensing Inhibitors Acting Against N-Acyl Homoserine Lactone Synthase as Druggable Target. Scientific Reports, 4, 7245.
- Chenia H.Y., 2013. Anti-Quorum Sensing Potential of Crude *Kigelia africana* Fruit Extracts. Sensors. 13 (3): 2802-2817.
- Cherif-Antar A., Moussa-Boudjemâa B., Didouh N., Medjahdi K., Mayo B., Şórez A.B., 2016. Diversity And Biofilm-Forming Capability Of Bacteria Recovered From Stainless Steel Pipes Of A Milk-Processing Dairy Plant. Dairy Science & Technology. 96 (1): 27-38.
- Choo J. H., Rukayadi Y., Hwang J. K., 2006. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. Letters in Applied Microbiology, 42(6): 637-641.
- Cleto S., Matos S., Kluskens L., Vieira M. J., 2012. Characterization of Contaminants From a Sanitized Milk Processing Plant. PLoS One, 7(6), e40189.
- Congmin X.U., Zhang Y., Cheng G., Wensheng Z.H.U., 2006. Corrosion and Electrochemical Behavior of 316L Stainless Steel in Sulfate-Reducing and Iron-oxidizing Bacteria Solutions | Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20576108). Chinese Journal of Chemical Engineering. 14 (6): 829-834.
- Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Van Landschoot A., Heyndrickx M., De Vos P., 2010. How Can the Type of Dairy Farming Influence the Bacterial Flora in Milk?. Organic Farming and Peanut Crops, 123-136.
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J., 1987. Bacterial Biofilms In Nature and Disease. Annual Reviews In Microbiology. 41 (1): 435-464.
- Cullimore D.R., 2000. Bacterial Identification. CRC Press Ltd. ISBN: 1-56670-392-1. 209 P.

- Cruz C.D., Fletcher G.C., 2011. Prevalence and Biofilm-Forming Ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand Mussel (*Perna canaliculus*) Processing Plants. *Food Microbiology*. 28 (7): 1387-1393.
- Cvetkovski S., 2012. Stainless Steel in Contact with Food and Beverage. *Metallurgical and Materials Engineering*. 18 (4): 283-293.
- Çetin D., 2007. Ham Petrol Sahalarından İzole Edilen Sülfat İndirgeyen Bakterilerin Korozyon Etkisinin Belirlenmesi ve Önlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Doktora Tezi, 124 sayfa.
- Çöl B., Aksu H., 2007. The Effective Factors on Microbial Load of Air in Food Plant and Air Sampling Techniques. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 1 (2): 24-47.
- Dalmasso M., Jordan K., 2014. Absence of Growth of *Listeria monocytogenes* in Naturally Contaminated Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Research*. 81 (01): 46-53.
- Darwish S.F., Asfour H.A., 2013. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-9.
- Dell'Erba A., Falsanisi D., Liberti L., Notarnicola M., Santoro D., 2007. Disinfection By-Products Formation During Wastewater Disinfection with Peracetic Acid. *Desalination*, 215(1-3), 177-186.
- Delbès-Paus C., Pochet S., Helinck S., Veisseire P., Bord C., Lebecque A., Coton M., Desmasures N., Coton E. Montel M.C., 2012. Impact of Gram-Negative Bacteria in Interaction with a Complex Microbial Consortium on Biogenic Amine Content and Sensory Characteristics of An Uncooked Pressed Cheese. *Food Microbiology*. 30 (1): 74-82.
- Del Monte D., De Martino L., Marandino A., Fratianni F., Nazzaro F., De Feo V., 2015. Phenolic Content, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*, 74, 342-347.
- De Oliveira M. M. M., Brugnera D. F., Das Graças Cardoso M., Alves E., Piccoli R. H., 2010. Disinfectant Action of *Cymbopogon* sp. Essential Oils in Different Phases of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel Surface. *Food Control*, 21(4): 549-553.

- Deng Y., Yang G., Yue J., Qian B., Liu Z., Wang D., Zhao Y., 2014. Influences of Ripening Stages and Extracting Solvents on the Polyphenolic Compounds, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Blueberry Leaf Extracts. *Food Control*, 38: 184-191.
- Dong Y.H., Wang L.H., Zhang L.H., 2007. Quorum-Quenching Microbial Infections: Mechanisms and Implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 362 (1483): 1201-1211.
- Dosti B., Guzel-Seydim Z., Greene A.K., 2005. Effectiveness of Ozone, Heat and Chlorine for Destroying Common Food Spoilage Bacteria in Synthetic Media and Biofilms. *International Journal Of Dairy Technology*. 58 (1): 19-24.
- Dufour M., Simmonds R.S., Bremer P.J., 2004. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of "natural" antimicrobials against dairy biofilms. *Journal of Food Protection*. 67 (7): 1438-1443.
- Douglas L.J., 2003. *Candida* Biofilms and Their Role in Infection. *Trends in Microbiology*. 11 (1): 30-36.
- Dzieciol M., SchornSeiner E., Muhterem-Uyar M., Sessl B., Wagner M., Schmitz-Esser S., 2016. Bacterial Diversity Of Floor Drain Biofilms and Drain Waters In A *Listeria monocytogenes* Contaminated Food Processing Environment. *International Journal Of Food Microbiology*. 223: 33-40.
- Eduok U., Khaled M., Khalil A., Suleiman R., El Ali B., 2016. Probing the Corrosion Inhibiting Role of a Thermophilic *Bacillus licheniformis* Biofilm on Steel in a Saline Axenic Culture. *RSC Advances*. 6 (22): 18246-18256.
- Erdim N., 1987. Tarama Elektron Mikroskopunun Temel Prensipleri ve Numune Hazırlama. İ.Ü. Orman Fakültesi Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü. 1: 102-124.
- Eriş R., 2011. Gül (*Rosa Damascena Mill.*) Yağı, Absolütü ve Gül Suyunun *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, CV026 ve CVIR 07 Suşlarının Çevreyi Algılama Sistemleri (Quorum Sensing) Üzerine Etkisinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Y. Lisans Tezi, 101 sayfa.

- Erkmen J., Yapici S., 2016. A Environmentally Friendly Process for Boric Acid and Sodium Hydroxide Production from Borax; Bipolar Membrane Electrodialysis. *Desalination and Water Treatment*. 57 (43): 20261-20269.
- Eti Maden, 2014. Etimatik Bor Temzilik Ürünü Güvenlik Bilgi Formu. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2: 1-15.
- EUCAST, 2014. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. 4. Versiyon.
- Evrensel S.S., Temelli S., Anar Ş., 2003. Mandıra Düzeyindeki İşletmelerde Beyaz Peynir Üretiminde Kritik Kontrol Noktalarının Belirlenmesi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 27: 29-35.
- Fadel H.M., Ismail J., 2009. Prevalence and Significance of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacteriaceae* Species in Selected Dairy Products and Handlers. *International Journal of Dairy Science*. 4 (3): 100-108.
- Faller M., Buzzi S., 2005. Corrosion Behaviour of Glass-Bead Blasted Stainless Steel Sheets and Other Sheets with Dull Surface Finish in a Chloride Solution. *Materials and Corrosion*. 56 (6): 373-378.
- FDA, 2017. US Food and Drug Administration: Compliance with and Recommendations for Implementation of the Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption for Sprout Operations: Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm510578.htm>. Erişim Tarihi; 08.04.2017.
- Federle M. J., Bassler, B. L., 2003. Interspecies Communication in Bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9): 1291-1299.
- Fekadu S., Merid Y., Beyene H., Testhome W., Gebre-Selassie S., 2015. Assessment of Antibiotic-and Disinfectant-Resistant Bacteria in Hospital Wastewater, South Ethiopia: a Cross-Sectional Study. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 9 (02): 149-156.
- Feng P., Weagant S.D., Jinneman K., 2011. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*.

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>. Erişim Tarihi: 08.04.2017.

- Ferreira E.A., Della Noce R., Fugivara C.S., Benedetti A.V., 2013. Influence of Ethanol, Acidity and Chloride Concentration on the Corrosion Resistance of AISI 316L Stainless Steel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 24 (3): 397-405.
- Fetzner S., 2015. Quorum Quenching Enzymes. *Journal of Biotechnology*. 201: 2-14.
- Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J., 2000. Properties of the Stainless Steel Substrate, Influencing the Adhesion of Thermo-resistant *Streptococci*. *Journal of Food Engineering*. 43 (4): 235-242.
- Fouda A.S., Diab M.A., Fathy S., 2017. Role of Some Organic Compounds as Corrosion Inhibitors for 316L Stainless Steel in 1 M HCl. *Int. J. Electrochem. Sci*. 12: 347-362.
- Galvele J.R., 1976. Transport Processes and the Mechanism of Pitting of Metals. *Journal of The Electrochemical Society*. 123 (4): 464-474.
- Gavin R., Merino S., Altarriba M., Canals R., Shaw J.G., Tomás J.M., 2003. Lateral Flagella are Required for Increased Cell Adherence, Invasion and Biofilm Formation by *Aeromonas* spp., *Fems Microbiology Letters*. 224: 77–83
- Geng S., Sun J., Guo L., 2015. Effect of Sandblasting and Subsequent Acid Pickling and Passivation on the Microstructure and Corrosion Behavior of 316L Stainless Steel. *Materials & Design*. 88: 1-7.
- Gibson H., Taylor J. H., Hall K. E., Holah J. T., 1999. Effectiveness of Cleaning Techniques Used in the Food Industry in Terms of the Removal of Bacterial Biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 41-48.
- Göktan D., Tunçel G., 2014. Temel Gıda Hijyeni. *Gıda Hijyeni* 1. 1. Baskı. Sıdaş Yayıncılık, İstanbul, 210 sayfa.
- Gopal N., Hill C., Ross P.R., Beresford T.P., Fenelon M.A., Cotter P.D., 2015. The Prevalence And Control Of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria In The Dairy Industry. *Frontiers In Microbiology*. 6: 1418-1436
- Graham D., 2011. In-Plant Air Handling and Food Safety: There is a Connection. *Food Safety Magazine*. 17 (3): 22-25.



- Grandclément C., Tannières M., Moréra S., Dessaux Y., Faure D., 2016. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS microbiology Reviews*. 40 (1): 86-116.
- Güçbilmez Ç.M., Yemenicioğlu A., Arslanoğlu A., 2007. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Edible Zein Films Incorporated with Lysozyme, Albumin Proteins and Disodium EDTA. *Food Research International*. 40 (1): 80-91.
- Guezennec A.G., Michel C., Ozturk S., Togola A., Guzzo J., Desroche N., 2015. Microbial Aerobic and Anaerobic Degradation Of Acrylamide In Sludge And Water Under Environmental Conditions—Case Study In A Sand and Gravel Quarry. *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (9): 6440-6451.
- Gün İ., Ekinci F.Y., 2009. Biyofilmler: Yüzedeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda Derg.* 34 (3): 165-173.
- Gündoğan N., Ataoğ Ö., 2012. Et Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Stafilokok*'ların Biyofilm Üretimi ve Dnaz Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 69 (3): 135-142.
- Gunduz G.T., Tuncel G., 2006. Biofilm formation in An Ice Cream Plant. *Antonie van Leeuwenhoek*. 89 (3): 329-336.
- Habimana O., Heir E., Langsrud S., Asli A.W., Moretro T., 2010. Enhanced Surface Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in Biofilms Formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* Isolate from Meat-Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (13): 4557-4559.
- Halkman A.K., 2013. Gıda Mikrobiyolojisi, Ders Notları. Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. 90s.
- Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A., 2007. Assessing Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Strains. *Food Microbiology*. 24 (4): 380-392.
- Hassanshahian M., Khosravi F., 2015. Study the Antimicrobial Effects of *Artemisia santonica* Extract on Some Pathogenic Bacteria. *Advanced Herbal Medicine*. 1 (4): 43-46.

- Helander I., Von Wright A., Mattila-Sandholm T.M., 1997. Potential of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobials Against Gram-Negative Bacteria. Trends in Food Science & Technology. 8 (5): 146-150.
- Harrigan W.F., 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd Edition. Academic Press. London-Uk. Isbn 0-12-326043-3. 532p.
- Herald P.J., Zottola E.A., 1988. Attachment Of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values, Journal Of Food Science. 53: 1549-1562.
- Hervert C. J., Alles A. S., Martin N. H., Boor K. J., Wiedmann M., 2016. Evaluation of Different Methods to Detect Microbial Hygiene Indicators Relevant in the Dairy Industry. Journal of Dairy Science, 99(9), 7033-7042.
- Hitchins A.D., Jinneman K., Chen Y., 2016. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Ch. 10 in U.S. FDA BAM. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>. Erişim Tarihi; 08.04.2017.
- Hoque M.M., Naser I.B., Bari S.N., Zhu J., Mekalanos J.J., Faruque S.M., 2016. Quorum Regulated Resistance of *Vibrio cholerae* against Environmental Bacteriophages. Scientific Reports, 6.
- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O., 2010. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. International journal of Antimicrobial Agents, 35(4), 322-332.
- Huang M.B., Baker C.N., Banerjee S., Tenover F.C., 1992. Accuracy of the E Test for Determining Antimicrobial Susceptibilities of *Saphylococci*, *enterococci*, *Campylobacter jejuni*, and Gram-Negative Bacteria Resistant to Antimicrobial Agents. Journal of Clinical Microbiology. 30 (12): 3243-3248.
- Irkin R., 2010. Determination Of Microbial Contamination Sources For Use in Quality Management Of Cheese Industry: “Dil” Cheese As an Example. Journal Of Consumer Protection and Food Safety. 5: 91-96.
- ISO, 2004. EN-ISO 21528-1:2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of *Enterobacteriaceae*. 1. Baskı. 12 sayfa.

- İpek D., Demirel Zorba N.N., 2014. Effects of Process Stages on Turkish Delight/Lokum Microbiological Quality. *International Journal of Food Science&Technology*. 49 (9): 2061-2066.
- İpek D., Zorba N. N., 2017. Microbial Load of White Cheese Process Lines after CIP and COP: A Case Study in Turkey. *LWT-Food Science and Technology* :Baskıda (In Press).
- Ismail R., Aviat F., Michel V., Le Bayon I., Gay-Perret P., Kutnik M., Fédérighi M., 2013. Methods for Recovering Microorganisms from Solid Surfaces Used in the Food Industry: A Review of the Literature. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*. 10 (11): 6169-6183.
- Jones M.B., Blaser M.J., 2003. Detection of a Lux S-Signaling Molecule in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*. 71 (7): 3914-3919.
- Jullien C., Bénézech T., Carpentier B., Leuret V., Faille C., 2003. Identification of Surface Characteristics Relevant to the Hygienic Status of Stainless Steel for the Food Industry. *Journal of Food Engineering*. 56 (1): 77-87.
- Kala R., Chauhan H., Rajput A., Kutty R., 2012. Biofilm Characterization and Quorum Quenching in Pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int.J. Of Advanced Biotechnology and Research*. 3 (1): 515-522.
- Kalia V. C., 2013. Quorum Sensing Inhibitors: An Overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224-245.
- Kannan C., Aditi P., Zwanenburg B., 2015. Quenching the Action of Germination Stimulants Using Borax and Thiourea, a New Method for Controlling Parasitic Weeds: A Proof of Concept. *Crop Protection*. 70, 92-98.
- Karaboz İ., Sukatar A., 2004. Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2 (5): 23-32.
- Karagul-Yuceer Y., Isleten M., Uysal-Pala C., 2007. Sensory Characteristics Of Ezine Cheese, *Journal Of Sensory Studies*. 22: 49-65, 6

- Karagul-Yuceer Y., Tuncel B., Guneser O., Engin B., Isleten M., Yasar K., Mendes M., 2009. Characterization Of Aroma-Active Compounds, Sensory Properties and Proteolysis in Ezine Cheese, Journal Of Dairy Science. 92: 4146-4157,
- Karapınar M., 1990. Gıdaların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü. E.Ü. Ege Meslek Yüksekokulu Yayın N:6, 159 S. E.Ü. Basımevi-Bornova-İzmir.
- Kavanaugh N.L., Ribbeck K., 2012. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 78 (11): 4057-4061.
- Kayaardı S., 2014. Gıda Hijyeni ve Sanitasyonu. Sıdaş Yayın Evi, 5. Baskı, 252 sayfa, İstanbul.
- Kesenkaş H., Akbulut N., 2010. İzmir İlinde Satılan Sokak Sütleri İle Orta ve Büyük Ölçekli Çiftliklerde Üretilen Sütlerin Özelliklerinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 47 (2).
- Kim H.S., Park H.D., 2013. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. PloS one, 8 (9): e76106.
- Kirby R.M., Bartram J., Carr R., 2003. Water in Food Production and Processing: Quantity and Quality Concerns. Food Control. 14 (5): 283-299.
- Kitis M., 2004. Disinfection of Wastewater with Peracetic Acid: A Review. Environment International, 30(1), 47-55.
- Klämpfl T.G., Shimizu T., Koch S., Balden M., Gemein S., Li Y.F., Mitra A., Zimmermann J.L., Gebel J., Morfil G.E., Schmidt H.U., 2014. Decontamination of Nosocomial Bacteria Including *Clostridium difficile* spores on Dry Inanimate Surface by Cold Atmospheric Plasma. Plasma Processes and Polymers. 11 (10): 974-984.
- Koh C.L., Sam C.K., Yin W.F., Tan L.Y., Krishnan T., Chong Y.M., Chan K.G., 2013. Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-Quorum Sensing Compounds. Sensors. 13 (5): 6217-6228.

- Kosta M., Mataragas M., Skandamis P., Drosinos E.H., 2010. Prevalence and Sources Of Cheese Contamination with Pathogens At Farm And Processing Levels. *Food Control*. 21 (6): 805-815.
- Kruszewski K.M., Nistico L., Longwell M.J., Hynes M.J., Maurer J.A., Hall-Soodley L., Gawalt E.S., 2013. Reducing *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation on Stainless Steel 316 L Using Functionalized Self-Assembled Monolayers. *Materials Science and Engineering: C*. 33 (4): 2059-2069.
- Kumar C.G., Anand S.K., 1998. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review. *International Journal Of Food Microbiology*. 42 (1): 9-27.
- Kumar N., Kumar A., Singh A.K., Das G., 2014. Corrosion Resistance of Austenitic Cr-Ni Stainless Steel in 1 M HCl. *International Journal of Mechanical Engineering and Robotics Research*. 3 (3): 21.
- Kumari S., Sarkar P.K., 2014. In vitro Model Study for Biofilm Formation by *Bacillus cereus* in Dairy Chilling Tanks and Optimization of Clean-in-Place (CIP) Regimes Using Response Surface Methodology. *Food Control*. 36 (1): 153-158.
- Kumari S., Sarkar P.K., 2016. *Bacillus cereus* Hazard and Control in Industrial Dairy Processing Environment. *Food Control*. 69: 20-29.
- Kurita N., Koike S., 1982. Synergistic Antimicrobial Effect of Sodium Chloride and Essential Oil Components. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46 (1): 159-165.
- Kure C.F., Skaar I., Brendehaug J., 2004. Mould Contamination in Production Semi-Hard Cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 93: 41-49.
- Kuru R., Yarat A., 2017. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. *Clinical Experimental Health Science*. 2017: 1-8.
- Kyung Y.M., 2009. Quorum Sensing Based Biofouling Control in Membrane Bioreactor for Advanced Water Treatment. Doktora Tezi. School of Chemical and Biological Engineering, The Graduate School, Seoul National University. 228 sayfa.
- Lade H., Paul D., Kweon J.H., 2014. Isolation and Molecular Characterization of Biofouling Bacteria and Profiling of Quorum Sensing Signal Molecules from

- Membrane Bioreactor Activated Sludge. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (2): 2255-2273.
- Lade H., Paul D., Kweon J.H., 2015. Combined Effects of Curcumin and (–)-Epigallocatechin Gallate on Inhibition of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Biofilm Formation in Wastewater Bacteria from Membrane Bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (11): 1908-1919.
- Lade H., Song W.J., Yu Y.J., Ryu J.H., Arthanareeswaran G., Kweon J.H., 2017. Exploring the Potential of Curcumin for Control of N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Biofouling in Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. *RSC Advances*. 7 (27): 16392-16400.
- Laird K., Armitage D., Phillips C., 2012. Reduction of Surface Contamination and Biofilms of *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus* Using a Citrus-Based Vapour. *Journal of Hospital Infection*, 80(1): 61-66.
- Lamberte L.E., Cabrera E.C., Rivera W.L., 2011. Activity of the Ethanolic Extract of Propolis (EEP) as a Potential Inhibitor of Quorum Sensing-Mediated Pigment Production in *Chromobacterium violaceum* and Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Philippine Agricultural Scientist*, 94 (1).
- Langsrud S., Sidhu M.S., Heir E., Holck A.L., 2003. Bacterial Disinfectant Resistance-a Challenge for the Food Industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51 (4): 283-290.
- Lasa I., Penadés J.R., 2006. Bap: A Family of Surface Proteins Involved in Biofilm Formation. *Research in Microbiology*, 157 (2): 99-107.
- Laurenço A., Machado H., Brito L., 2011. Biofilms of *Listeria monocytogenes* Produced at 12°C either in Pure Culture or in Co-Culture with *Pseudomonas aeruginosa* Showed Reduced Susceptibility to Sanitizers. *Journal of Food Science*, 76 (2): 143-148.
- Lazar V., Colta T., Marutestcu L., Ditu L.M., Carmen M., 2013. New Antiinfectious Strategy Based on Antimicrobial and Quorum Sensing Inhibitors from Vegetal Extracts and Propolis. *Sci Technol Edu.*, 23 (2): 1209-20.
- Leriche F., Bordessoules A., Fayolle K., Karoui R., Laval K., Leblanc L., Dufour E., 2004. Alteration of Raw-Milk Cheese by *Pseudomonas* spp.: Monitoring the Sources of

- Contamination Using Fluorescence Spectroscopy and Metabolic Profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 59 (1): 33-41.
- Lin W. C., Deng J. S., Huang S. S., Wu S. H., Lin H. Y., Huang G. J., 2017. Evaluation of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Ethanol Extracts from Different Varieties of Sanghuang Species. *RSC Advances*,7(13), 7780-7788.
- Lindsay D., Von Holy A., 2006. Bacterial Biofilms within the Clinical Setting: What Healthcare Professionals Should Know. *Journal of Hospital Infection*. 64 (4): 313-325.
- Lowry D., 2010. Advances in Cleaning and Sanitation. *Australian Journal of Dairy Technology*,65(2), 106.
- Luck H., Gavron H., 1990. In *Dairy Microbiology, The Microbiology Of Milk Products Vol 2*, 2<sup>nd</sup> Ed. R.K. Robinson. Elsevier Appl. Science Pub., 345-392.
- Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Magny P., 1990. Attachment Of *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *Journal Of Food Protection*. 53 (9): 742-746.
- Magesh H., Kumar A., Alam A., Sekar U., 2013. Identification of Natural Compounds Which Inhibit Biofilm Formation in Clinical Isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51: 764-772.
- Mahmood Z. A., Mahmood S. B. Z., 2013. Antibiotic Natural Products: Opportunities and Challenges. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Badajoz: Formatex Research Center, 823-833.
- Manefield M., De Nys R., Naresh K., Roger R., Givskov M., Peter S., Kjelleberg S., 1999. Evidence that Halogenated Furanones from *Delisea pulchra* Inhibit Acylated Homoserine Lactone (AHL)-Mediated Gene Expression by Displacing the AHL Signal from Its Receptor Protein. *Microbiology*, 145(2): 283-291.
- Manjumeena R., Duraibabu D., Sudha J., Kalaichelvan P.T., 2014. Biogenic Nanosilver Incorporated Reverse Osmosis Membrane for Antibacterial and Antifungal Activities Against Selected Pathogenic Strains: An Enhanced Eco-Friendly Water Disinfection Approach. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 49 (10): 1125-1133.

- Manap Ö., Gül H., 2008. Ezine Peynirinin Temel Özellikleri ve Ekonomik Değerleri Bağlamında Güncel Sorunları ve Çözüm Önerileri. Ezine Değerler Sempozyumu, 29-30 Ağustos. Çanakkale.
- Mariana N.S., Salman S.A., Neela V., Zambari S., 2009. Evaluation of Modified Congo Red Agar for Detection of Biofilm Produced by Clinical Isolates of Meticillin-Resistance *Staphylococcus aureus*. African J. Of Microbiology Resarch., 3 (6): 330-338.
- Martin F.A., Bataillon C., Cousty J., 2008. In situ AFM Detection of Pit Onset Location on a 304L Stainless Steel. Corrosion Science. 50 (1): 84-92.
- Maturin L., Peeler J.T., 2001. Chapter 3, Aerobic Plate Count. BAM (Bacteriological Analytical Manual). US Food and Drug Administration, Washington, DC.
- Melo J., Andrew P.W., Faleiro M.L., 2015. *Listeria monocytogenes* in Cheese and the Dairy Environment Remains A Food Safety Challenge: the Role of Stress Responses. Food Research International. 67: 75-90.
- Metin M., Öztürk G.F., 1995. Süt İşletmelerinde Sanitasyon (Temizlik Ve Dezenfeksiyon). E.Ü. Ege Meslek Yüksek Okulu Yayın No:17, S:410, E.Ü. Rektörlüğü Basımevi, Bornova.
- Mihalik K., Chung D. W., Crixell S. H., McLean R. J. C., Vattam D. A., 2008. Quorum Sensing Modulators of *Pseudomonas aeruginosa* Characterized in *Camellia sinensis*. Asian J Trad Med., 3(12), e23.
- Molva C., Sudagidan M., Okuklu B., 2009. Extracellular Enzyme Production and Enterotoxigenic Gene Profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Cheese in Turkey. Food Control, 20 (9): 829-834.
- Montel M.C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D.A., Desmasures N., Berthier F., 2014. Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota with Associated Benefits. International Journal of Food Microbiology, 177: 136-154.
- Morales P. A., Aguirre J. S., Troncoso M. R., Figueroa G. O., 2016. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Present in Spoiled Poultry Fillets Sold in Retail Settings. LWT-Food Science and Technology, 73: 609-614.



- Moslert J.F., Jooste P.J., 2002. In Dairy Microbiology Handbook: Quality Control in the Dairy Industry. Ch 14. Ed. Robinson R.K. USA. 655-765.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H., 2003, Manual Of Clinical Microbiology (8th Ed.), Asm Press, Washington D.C, USA Pp. 719-728.
- Nagy M.M., 2010. Quorum Sensing Inhibitory Activities of Various Folk Medicinal Plants and the Elucidation of the Thyme-Tetracycline Effect. PhD Dissertation (Doktora Tezi). Georgia State University, Georgia, USA.
- Nam A., Kweon J., Ryu J., Lade H., Lee C., 2015. Reduction of Biofouling Using Vanillin as a Quorum Sensing Inhibitory Agent in Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. Membrane Water Treatment, 6 (3): 189-203.
- Nan L., Ren G., Wang D., Yang K., 2016. Antibacterial Performance of Cu-Bearing Stainless Steel Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Whole Milk. Journal of Materials Science & Technology, 32 (5): 445-451.
- Nerín C., Aznar M., Carrizo D., 2016. Food Contamination During Food Process. Trends in Food Science & Technology, 48: 63-68.
- Ng W. L., Bassler B. L., 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. Annual Review of Genetics, 43: 197-222.
- Ordell A., Unnerstad H. E., Nyman A., Gustafsson H., Båge R., 2016. A Longitudinal Cohort Study of Acute Puerperal Metritis Cases in Swedish Dairy Cows. Acta Veterinaria Scandinavica, 58(1), 79.
- Osimani A., Garofalo C., Clementi F., Tavoletti S., Aquilanti L., 2014. Bioluminescence ATP Monitoring for the Routine Assessment of Food Contact Surface Cleanliness in A University Canteen. International Journal Of Environmental Research and Public Health, 11 (10): 10824-10837.
- O'Toole G.A., 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (47): 2437.
- Öksüz Ö., 1996. Çiğ Süt Mikroflorasının Beyaz Peynir Kalitesine ve Peyniraltı Suyu Özelliklerine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi, Türkiye.

- Ölmez Z., 2009. Süt Sanayisinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Türkiye.
- Özcan G., Demirel Zorba N.N., 2016. Combined Effect of Ultrasound and Essential Oils to Reduce *Listeria monocytogenes* on Fresh Produce. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 22 (4): 353-362.
- Özder A., Önal M., 2007. Trakya'da Özel Bir Süt İşleme Tesisi Tarafından Değerlendirilen Çiğ Sütlerin Somatik Hücre Sayısı ve Bazı Bileşenlerinin Tespiti. *Jotaf/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4 (2): 195-199.
- Özdikmenli S., Zorba N.N., 2014. The Effect of Essential Oils on *Staphylococcus aureus*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2 (5).
- Özer E., Kesenkaş H., 2015. Süt İşletmelerinde Hava Kalitesi ve Önemi. *Akademik Gıda*, 13 (1): 89-93.
- Park H., Yeo S., Ji Y., Lee J., Yang J., Park S., Shin H., Holzzapfel W., 2014. Autoinducer-2 Associated Inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 Reduces Virulence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control*, 45: 62-69.
- Pasinli A., Köksal N.S., 2009. Sıcak Daldırma Yöntemi ile Alüminyum Kaplanan Çelik Malzemelerde Yüksek Sıcaklık Oksidasyonunun İncelenmesi. *DEÜ Müh. Fak. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 11 (31): 2-9.
- Patterson A.G., Jackson S.A., Taylor C., Evans G.B., Salmond G.P., Przybilski R., Saal R.H.J., Fineran P.C., 2016. Quorum Sensing Controls Adaptive Immunity through the Regulation of Multiple CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 64 (6): 1102-1108.
- Poulsen L.V., 1999. Microbial Biofilm In Food Processing. *Lebensm. Wiss. U. Techn.*, 32 (6): 321-326.
- Quave C.L., Plano L.R., Pantuso T., Bennett B.C., 2008. Effects of Extracts from Italian Medicinal Plants on Planktonic Growth, Biofilm Formation and Adherence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118 (3): 418-428.

- Quave C. L., Plano L. R., Bennett B. C., 2011. Quorum Sensing Inhibitors of *Staphylococcus aureus* from Italian Medicinal Plants. *Planta medica*, 77(02), 188-195.
- Rahman M.R.T., Lou Z., Yu F., Wang P., Wang H., 2015. Anti-Quorum sensing and anti-Biofilm Activity of *Amomum tsaoko* (*Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie) on Foodborne Pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(2): 324-330.
- Rajala P., Bomberg M., Huttunen-Saarivirta E., Priha O., Tausa M., Carpén L., 2016. Influence of Chlorination and Choice of Materials on Fouling in Cooling Water System under Brackish Seawater Conditions. *Materials*, 9 (6): 475.
- Rao C.Y., Burge A.H., Chang J.C.S., 1996. Review Of Quantitative Standards and Guidelines for Fungi in Indoor Air. *Journal of The Air & Waste Management Association*, 46 (9): 899-908.
- Rathore P., Hegde A., Ginpalli K., Upadhy N., 2009. Evaluation of Antifungal Activity of Additives to Resilient Liners: An In Vitro Pilot Study. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 23 (1): 6-9.
- Robertson S.N., Gibson D., MacKay W.G., Reid S., Williams C., Birney R., 2016. Investigation of the Antimicrobial Properties of Modified Multilayer Diamond-Like Carbon Coatings on 316 Stainless Steel. *Surface and Coatings Technology*, 324: 72-78.
- Rossi C., Chaves-López C., Serio A., Goffredo E., Goga B.T.C., Paparella A., 2016. Influence Of Incubation Conditions On Biofilm Formation By *Pseudomonas fluorescens* Isolated From Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian Journal Of Food Safety*, 5 (3): 5793.
- Rückert A., Ronimus R.S., Morgan H.W., 2004. A Rapid-Based Survey Of Thermophilic *Bacilli* In Milk Powders From Different Countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 96: 263-272.
- Saising J., Singdam S., Ongsakul M., Voravuthikunchai S.P., 2012. Lipase, Protease, and Biofilm As the Major Virulence Factors in *Staphylococci* Isolated from Acne Lesions. *Bioscience Trends.*, 6 (4): 160-164.

- Schön K., SchornSeiner E., Dzieciol M., Wagner M., Müller M., Schmitz-Esser S., 2016. Microbial Communities in Dairy Processing Environment Floor-Drains are Dominated By Product-Associated Bacteria and Yeasts. *Food Control*, 70: 210-215.
- Salas B.V., Wiener M.S., Badilla G.L., Beltran M.C., Zlatev R., Soycheva M., Badilla G.L., Osuna L.V., Gaynor J.T., Gaynor J.T., 2012. H<sub>2</sub>S Pollution and Its Effect on Corrosion of Electronic Components. in *Air Quality-New Perspective*. InTech., 13: 262-286.
- Salo S., Ehavald H., Raaska L., Vokk R., Wirtanen G., 2006. Microbial Surveys in Estonian Dairies. *Lwt-Food Science And Technology*, 39 (5): 460-471.
- San N.O., Nazır H., Dönmez G., 2014. Microbially Influenced Corrosion and Inhibition of Nickel–Zinc and Nickel–Copper Coatings by *Pseudomonas aeruginosa*. *Corrosion Science*, 79: 177-183.
- Selby J.W., 1955. Corrosion in the Food Industry. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 2 (3): 71-74.
- Senadheera D., Cvitkovitch D. G., 2008. Quorum Sensing and Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. Springer, New York. 178-188.
- Sepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M., 2000. A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of *Staphylococcal* Biofilm Formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40 (2): 175-179.
- Serra D.O., Mika F., Richter A.M., Hengge R., 2016. The Green Tea Polyphenol EGCG Inhibits *E. coli* Biofilm Formation by Impairing Amyloid Curli Fibre Assembly and Downregulating the Biofilm Regulator CsgD via the  $\sigma$ E-dependent sRNA RybB. *Molecular Microbiology*. 101 (1): 136-151.
- Seyoux A., Zanna S., Allion A., Marcus P., 2015. The Fate of the Protective Oxide Film on Stainless Steel Upon early Stage Growth of a Biofilm. *Corrosion Science*, 91: 352-356.
- Shah M. A., Bosco S. J. D., Mir S. A., 2014. Plant extracts as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. *Meat Science*, 98(1): 21-33.

- Sharma M., Anand S.K., 2002. Biofilm Evaluation as An Essential Component Of HACCP For Food/Dairy Industry- A Case. *Food Control*, 13: 469-477.
- Shi X., Zhu X., 2009. Biofilm Formation and Food Safety in Food Industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.
- Shih P.C., Huang C.T., 2002. Effects of Quorum-Sensing Deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Antibiotic Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49 (2): 309-314.
- Simões L.C., Simoes M., Vieira M.J., 2007. Biofilm Interactions Between Distinct Bacterial Genera Isolated From Drinking Water. *Applied And Environmental Microbiology*, 73 (19): 6192-6200.
- Simões M., Simões L. C., Vieira M. J. 2010. A review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Singh A.K., Kumar R., 2014. Corrosion Investigation on the Performance of Stainless Steels 2205, 317 L and 316L in Peracids Bleach Media containing Chelant. *International Journal of Interdisciplinary Research*, 1 (8): 1-15.
- Singh J. P., Kaur A., Singh N., Nim L., Shevkani K., Kaur H., Arora D. S., 2016. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Properties of Jambolan (*Syzygium cumini*) Fruit Polyphenols. *LWT-Food Science and Technology*, 65:1025-1030.
- Sio C. F., Otten L. G., Cool R. H., Diggle S. P., Braun P. G., Bos R., Quax W. J., 2006. Quorum quenching by an N-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity*, 74(3): 1673-1682.
- Sivarooban T., Hettiarachchy N.S., Johnson M.G., 2008. Physical and Antimicrobial Properties of Grape Seed Extract, Nisin, and EDTA Incorporated Soy Protein Edible Films. *Food Research International*, 41 (8): 781-785.
- Skandamis P.N., Nychas G.J.E., 2012. Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (16): 5473-5482.
- Spanu C., Scarano C., Ibba M., Spanu V., De Santis E.P.L., 2015. Occurrence and Traceability of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Sheep's Milk Cheese-Making Plants Environment. *Food Control*, 47: 318-325.

- Song Z., Kong K. F., Wu H., Maricic N., Ramalingam B., Priestap H., Mathee K., 2010. *Panax ginseng* has Anti-Infective Activity Against Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Quorum Sensing, A Bacterial Communication Process Critical for Establishing Infection. *Phytomedicine*, 17(13), 1040-1046.
- Soni K. A., Jesudhasan P., Cepeda M., Widmer K., Jayaprakasha G. K., Patil B. S., Hume M. E., and Pillai S. D., 2008. Identification of Ground Beef-Derived Fatty Acid Inhibitors of Autoinducer-2- Based Cell Signaling, *J. Food Prot.*, 71: 134-138.
- Sun Z., He X., Brancaccio V.F., Yuan J., Riedel C.U., 2014. Bifidobacteria Exhibit LuxS-Dependent Autoinducer 2 Activity and Biofilm Formation. *PLoS One.*, 9 (2): e88260.
- Süvari Y., 2007. *Herba Hyperici* (Sarı Kantaron) ve *Folium Juglandis* (Ceviz Yaprağı) Bitkilerinin Yumuşak Çeliğin Korozyonu Üzerine İnhibitör Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.
- Şenel Y., Başoğlu F., 2002. Gıda İşletmelerinde Kullanılan Bazı Dezenfektanların Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri. *Uludağ Üniv., Zir. Fak., Derg.*, 16: 105-115.
- Taga M.E., Xavier K.B., 2005. Methods for Analysis of Bacterial Autoinducer-2 Production. *Current Protocols in Microbiology*, 1C-1.
- Tang K., Zhang Y., Yu M., Shi X., Coenye T., Bossier P., Zhang X.H., 2013. Evaluation of a New High-Throughput Method for Identifying Quorum Quenching Bacteria. *Scientific Reports*, 3: 2935.
- Teke Gündüz S., 2012. Çiğ Sütten İzole Edilen *Bacillus*'ların Adlandırılması ve Biyofilm Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Türkiye.
- Temelli S., Anar Ş., Sen C., Akyuva P., 2006. Determination Of Microbiological Contamination Sources During Turkish White Cheese Production. *Food Control*, 17 (11): 856-861.
- Tetrapak, 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems, Sweden. 436p.

- Tınaz G., 2012. Quorum Sensing (Çevreyi Algılama Sistemi). Marmara Üni. Eczacılık Fak. Ders Notu. [http://www.tmc-online.org/userfiles/file/AKG\\_Sunumlar/21nisan/gulgun\\_tinaz\\_cevreyi\\_algilama\\_siSemi.pdf](http://www.tmc-online.org/userfiles/file/AKG_Sunumlar/21nisan/gulgun_tinaz_cevreyi_algilama_siSemi.pdf). Erişim Tarihi: 08.05.2016.
- Tindall B. J., De Vos P., Trüper H. G., 2008. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes; XIth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7), 1737-1745.
- Tuncel B.N., Güneşer O., Engin B., Yaşar K., Zorba N.N., Karagül-Yüceer Y., 2010. Ezine Peyniri İ. Olgunlaşma Süresince Proteoliz Düzeyi. *Gıda*, 35 (1): 21-26.
- Tolmacheva, A. A., Rogozhin, E. A., Deryabin, D. G., 2014. Antibacterial and Quorum Sensing Regulatory Activities of Some Traditional Eastern-European Medicinal Plants. *Acta Pharmaceutica*, 64(2), 173-186.
- Turovskiy Y., Chikindas M.L., 2006. Autoinducer-2 Bioassay is a Qualitative, Not Quantitative Method Influenced by Glucose. *Journal Of Microbiological Methods*, 66 (3): 497-503.
- Türker O.C., Türe C., Böcük H., Yakar A., 2014. Constructed Wetlands as Green Tools for Management of Boron Mine Wastewater. *International journal of phytoremediation*, 16 (6): 537-553.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS), 2015. Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Cilt 1,2,3.
- Unsal T., İlhan-Sungur E., Arkan S., Cansever N., 2016. Effects of Ag and Cu Ions on the Microbial Corrosion of 316L Stainless Steel in the Presence of *Desulfovibrio* sp. *Bioelectrochemistry*, 110: 91-99.
- Üçüncü M., 2005. Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir. 605s.
- Ünlütürk A., Turantaş F., 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. Bornova, İzmir. 200s.
- Vaara M., 1999. Lipopolysaccharide and the Permeability of the Bacterial Outer Membrane. *Endotoxin in Health and Disease*, 31-38.

- Van Houdt R., Michiels C.W., 2005. Role of Bacterial Cell Surface Structures in *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Research in Microbiology*, 156 (5-6): 626-633.
- Valeriano C., De Oliveira T.L.C., De Carvalho S.M., Das Graças Cardoso M, Alves E., Piccoli R.H., 2012. The Sanitizing Action of Essential Oil-Based Solutions Against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 Stainless Steel. *Food Control*. 25 (2): 673-677.
- Vázquez-Sánchez D., Cabo M.L., Rodríguez-Herrera J.J., 2014. Single and sequential application of Electrolyzed Water with Benzalkonium Chloride or Peracetic Acid for Removal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Food Safety*, 34 (3): 199-210.
- Verma J., Taiwade R.V., Khatirkar R.K., Sapate S.G., Gaikwad A.D., 2017. Microstructure, Mechanical and Intergranular Corrosion Behavior of Dissimilar DSS 2205 and ASS 316L Shielded Metal Arc Welds. *Transactions of the Indian Institute of Metals*, 70 (1): 225-237.
- Vilchez R., Lemme A., Thiel V., Schulz S., Sztajer H., Wagner-Döbler I., 2007. Analysing Traces of Autoinducer-2 requires Standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 387 (2): 489-496.
- Vural T., Çelen E., 2005. Sıvı Dezenfektan Olarak Hidrojen Peroksit, Perasetik Asit ve Türevi Alet Dezenfektanlarının Kullanım İlkeleri. Kombinasyonlarının Kıyaslanması. Akdeniz Üniversitesi, 4, 19-05. [www.das.org.tr/kitaplar/kitap2005/19-05.pdf](http://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2005/19-05.pdf)
- Waak E., Tham W., Danielsson-Tham M.L., 2002. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Raw Whole Milk in Farm Bulk Tanks and in Dairy Plant Receiving Tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7): 3366-3370.
- Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G., 2003. Activity and Mechanisms of Action of Selected Biocidal Agents on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 240-247.

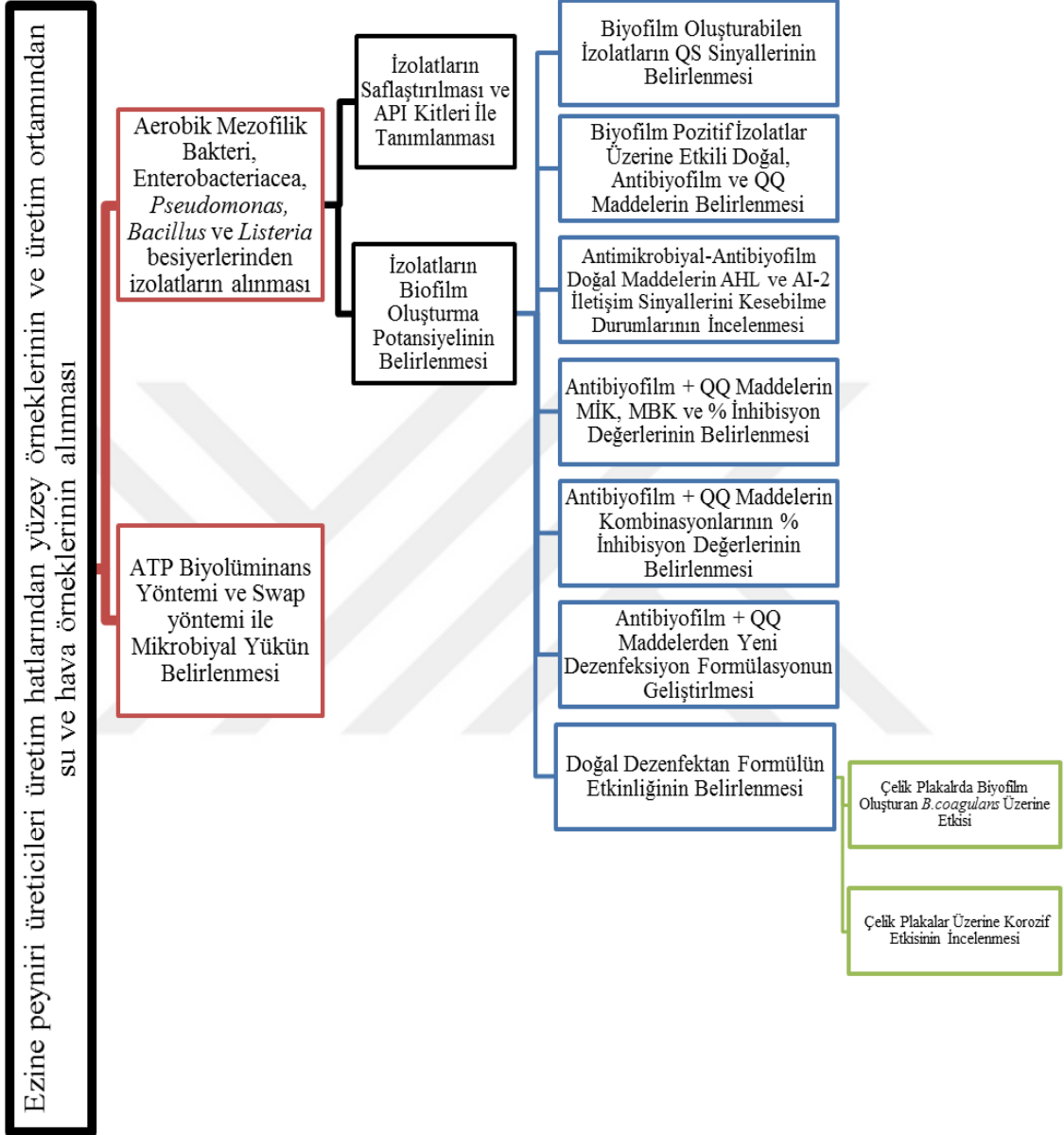


- Walsh C., Meade J., McGill K., Fanning, S., 2012. The Biodiversity of Thermotolerant Bacteria Isolated from Whey. *Journal of Food Safety*, 32(2): 255-261.
- Wang H., Hu C., Hu X., Yang M., Qu J., 2012. Effects of Disinfectant and Biofilm on the Corrosion of Cast Iron Pipes in a Reclaimed Water Distribution System. *Water Research*, 46 (4): 1070-1078.
- Wang Y., Wu Y., Yang H., Xue X., Liu Z., 2016. Co-Doping TiO<sub>2</sub> with Boron and/or Yttrium Elements: Effects on Antimicrobial Activity. *Materials Science and Engineering, B* (211): 149-155.
- Waters C. M., Bassler B. L., 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 319-346.
- WHO, 2006. World Health Organization: Guidelines for Drinking-Water Quality. 3rd Edition. 1. Cilt. 595 s. ISBN 92 4 154696 4.
- Wiedmann M., Weilmeier D., Dineen S.S., Ralyea R., Boor K.J., 1999. Molecular and Phenotypic Characterization Of *Pseudomonas* spp. Isolated From Milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2085-2095.
- Wijnker J.J., Koop G., Lipman L.J.A., 2006. Antimicrobial Properties of Salt (NaCl) Used for the Preservation of Natural Casings. *Food microbiology*, 23 (7): 657-662.
- Winkler A., Nikoleski D., 2012. Ensuring Water Quality In Food Processing. *New Food*, 15 (1): 51-53.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I. M., Mattila-Sandholm, T., 2001. Microbiological Methods for Testing Disinfectant Efficiency on *Pseudomonas* Biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20(1), 37-50.
- Wirtanen, G., Salo, S., 2003. Disinfection in Food Processing—Efficacy Testing of Disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2), 293-306.
- Yadav M., Kumar S., Sinha R.R., Bahadur I., Ebenso E.E., 2015. New Pyrimidine Derivatives as Efficient Organic Inhibitors on Mild Steel Corrosion in Acidic Medium: Electrochemical, SEM, EDX, AFM and DFT Studies. *Journal of Molecular Liquids*, 211: 135-145.

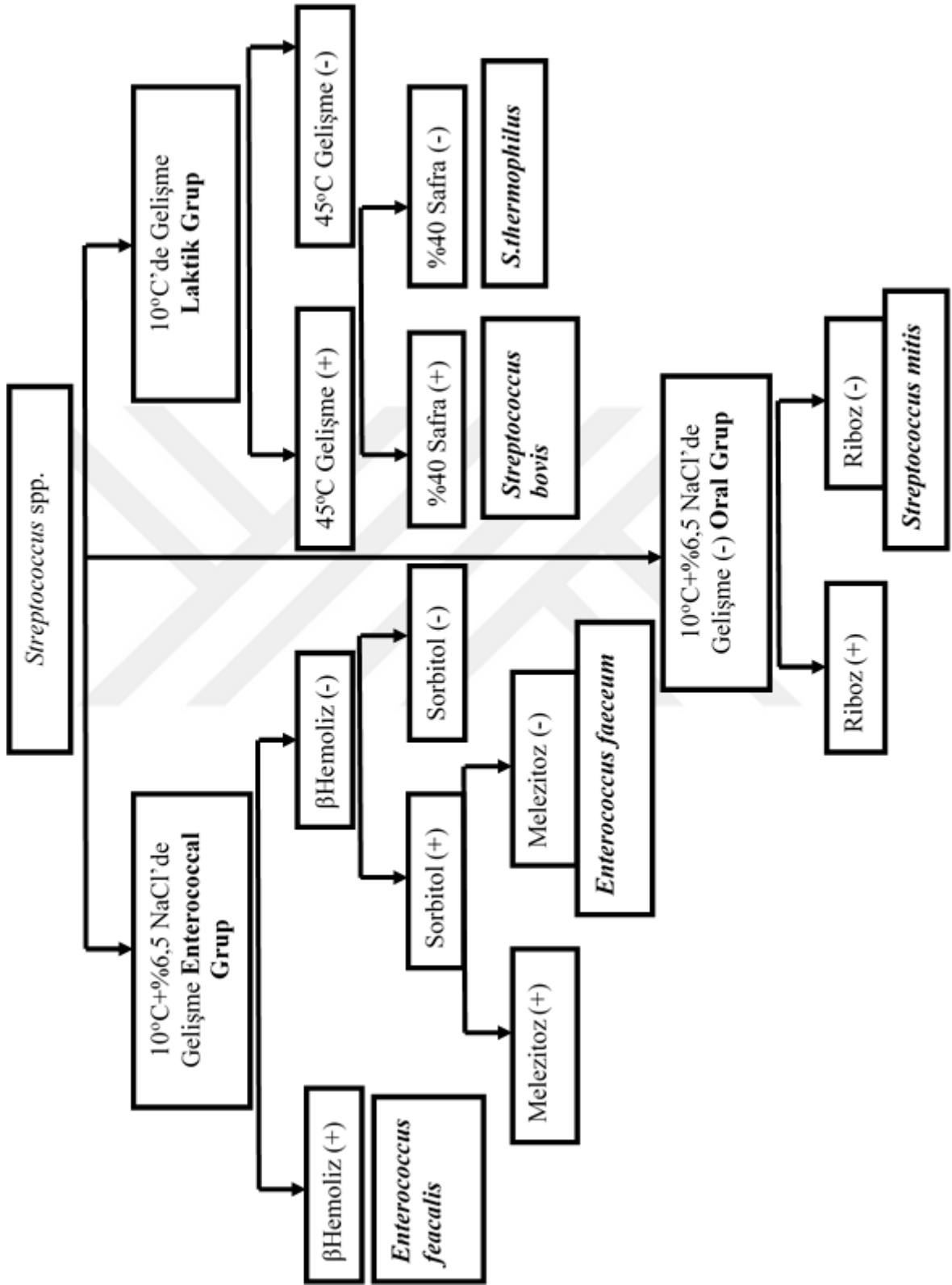
- Yuceer Y.K., Tuncel B., Guneser O., Engin B., Isleten M., Yasar K., Mendes M., 2009. Characterization of Aroma-Active Compounds, Sensory Properties, and Proteolysis in Ezine cheese. *Journal of Dairy Science*, 92 (9): 4146-4157.
- Yıldırım H., 2013. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Türkiye.
- Yılmaz M.T., 2012. Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Koncentrations of Boron Compounds Against Several Bacterial Strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42 (2): 1423-1429.
- Zhang Y., Yan M., Gao P., Jiang J., Zhang G., Li J., Shuang S., 2015. Immobilization of Uricase-Gold Nanoparticles Composite Nanomaterial on a Biofilm and Its Application to Determination of Uric acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 51 (4): 470-478.
- Zhang Q., Yang Q., Yang W., Wu K., Wu J., Dickinson D., Hsu S., 2016. Virucidal Capacity of Novel ProtecTeaV Sanitizer Formulations Containing Lipophilic Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG). *J Antivir Antiretrovir Res Ther.*, 1(002).
- Zhu S., Wu H., Zeng M., Zunying L., Zhao Y., Dong S., 2015. Regulation of Spoilage-Related Activities of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella baltica* by an Autoinducer-2 Analogue,(Z)-5-(Bromomethylene) furan-2 (5H)-One. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39 (6): 719-728.
- Zou L., Meng J., McDermott P.F., Wang F., Yang Q., Cao G., Zhao S., 2014. Presence of Disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (10): 2644-2649.



## EK 1. Şekil 1. Çalışmanın İş Akış Planı



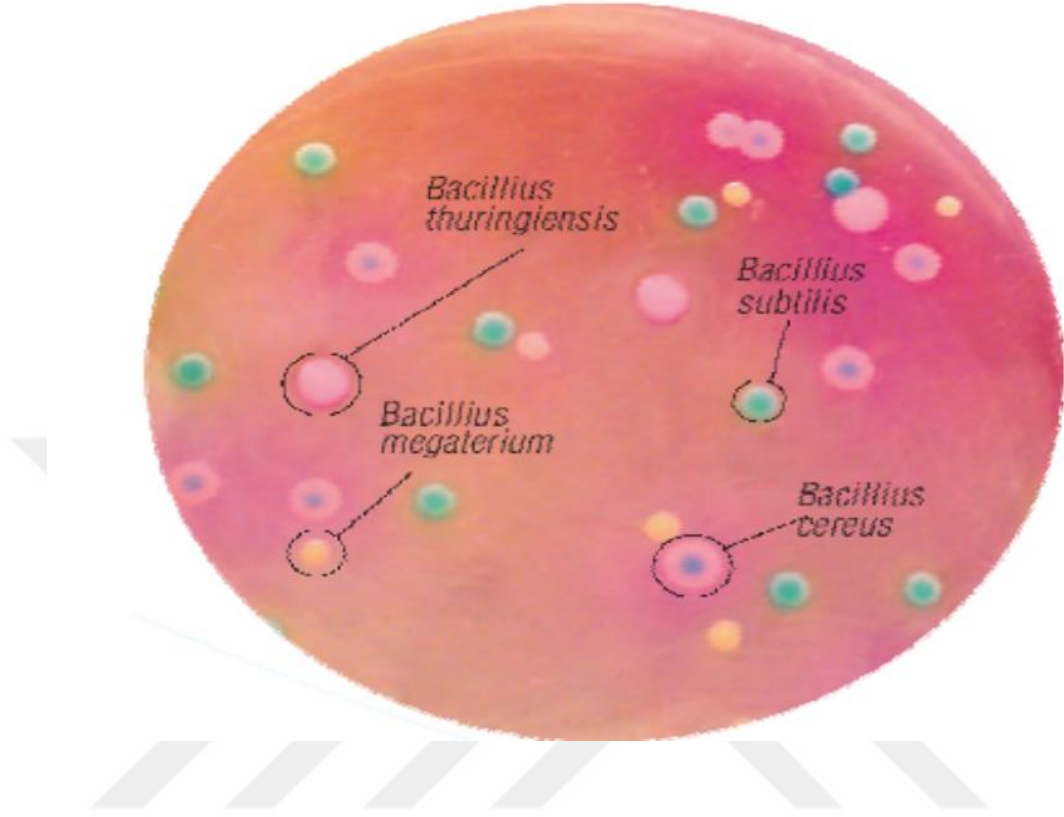
EK 2. Şekil 2. *Streptococcus* spp. Tanımlama Anahtarı (Cullimore, 2000)



EK 3. Çizelge 1. İçerikten Hazırlanan Besiyerler

| Besiyer                 | İçerik   | Referans   |
|-------------------------|--|--|
| Congo Red Agar          | 50 gr sükröz (PubChem CID:5988), 37gr Brain Heart Infusion Broth (Merck 110493, Almanya), 10 gr agar (Merck 101614, Almanya), 0,8 g Congo Red (PubChem <a href="#">CID:11314</a> )ve 1000 ml saf su ile hazırlanmıştır. 121°C/15 dk otoklavda steril edilerek kullanılmaktadır.  | (Arciola ve ark., 2002; Mariana ve ark., 2009; Gündoğan ve Ataol, 2012; Kala ve ark., 2002; Saising, 2012)       |
| AB Besiyeri             | NaCl (17,5g) (PubChem CID: 5234), MgSO <sub>4</sub> (12,3g) (PubChem CID: 24083), casamino asit (2,0g) (22090, Sigma-Aldrich, Almanya), saf su (970 ml). Çözününen maddelerin pH'sı 3N NaOH (PubChem CID: 14798) kullanılarak 7,5'e ayarlanıp; 121°C/15 dk otoklavda steril edilmektedir. Karışım soğuduktan sonra 10'ar ml steril stok solüsyonlar eklenerek AB besiyeri hazırlanır. Stok solüsyonlar; 1M potasyum fosfat (pH:7,0) (PubChem CID: 62657), 0,1M L-arjinin (PubChem CID: 6322) ve gliserol (PubChem CID: 753)'dir. | (Almasoud et.al., 2016; Zhu et.al., 2015)  |
| D/E Nötralizasyon Broth | Glikoz (10g) (PubChem CID: 79025), kazein (5 g) (PubChem CID: 73995022) ve Yeast ekstrakt (2,5g) (Merck 111926, Almanya) 1 litre saf su ile hazırlanıp; pH (7,6±0,2) değeri kontrol edilerek 121°C/15 dk otoklavda steril edilerek kullanılmaktadır.   | (Doufour ve ark., 2004; Dosti ve ark., 2005; Ölmez, 2009; Valerino ve ark., 2012; Vazquez-Sanchez ve ark., 2013) |

EK 4. Şekil 3. Kromojenik Hicrome *Bacillus* Agar'da (92325, Sigma-Aldrich, İsviçre)  
Koloni Renlerine Göre *Bacillus* spp.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Dilvin İPEK

Doğum Yeri: Biga/ Çanakkale

Doğum Tarihi: 06/10/1982

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Gıda Mühendisliği Bölümü / Ege Üniversitesi, İzmir.

Yüksek Lisans Öğrenimi: Gıda Mühendisliği Bölümü / Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar -SCI -Diğer

İpek D., Zorba N.N., 2017. Determination Effects of a Natural Disinfectant Formulation on Biofilm Positive Bacteria and Stainless-Steel Surfaces. Basımda (In Press).

İpek D., Zorba N.N., 2017. Quorum Sensing Signals Presence of Gram Positive/Negative Biofilm Isolates from dairy Industry Process lines/Area. Basımda (In Press).

İpek D., Zorba N.N., 2017. Microbial Load of White Cheese Process Lines after CIP and COP: A Case Study in Turkey. Basımda (In Press).

İpek D., Zorba N.N., 2014. Effects of Process Stages on Turkish Delight/Lokum Microbiological Quality. Int. J.of Food Science&Technology, 49(9): 2061-2066.

İpek D., Zorba N.N., 2008. Türk Lokumuna Uygulanan Farklı Ambalajlama Tekniklerinin Mikrobiyolojik Kalitesine Etkileri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2008(1) 1-6. www.teknolojikaraştırmalar.com. ISSN 1306-7648.

İpek D., Zorba M., 2007. Gıda Endüstrisinde Risk Analizi ve Yönetimi. Akademik Gıda Dergisi. Temmuz-Ağustos 2007. Yıl:5. Sayı:28. 28-35. ISSN 1304-7582.



b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

- İpek, D., Zorba N. N., 2016. Microbial Load of White Cheese Process Lines after CIP and COP: A Case Study in Turkey. Poster Presentation. 3 rd. European Congress on Microbial Biyofilms-Basic and Clinical Aspects, Foodmicro2016. July 19-22, 2016. Dublin, Ireland.
- İpek D., Zorba N. N., 2015. Importance of the Biyofilms on Food Safety Sustainability. Oral Presentation. Regional Workshop on Sustainable Management of Food Security. Turkish Academy of Sciences (TÜBA), The Association of Academies and Societies of Sciences in Asia (aassa) and The Global Network of Science Academies (iap), Oral Presentation,9-10 April, 2015, İstanbul, Turkey.
- İpek D., Zorba M., Zorba N. N., 2015. Hazard Analyses and Critical Control Point's System Optimization in "Tahini Halva" Production. Poster Presentation. International Journal of Food Science and Technology (Ifst) 50 th Volume Celebration Conference, 17-19 February, 2015, Lincoln University, New Zealand.
- Cost Action FA1202-2nd BacFoodNet Training School: Hands-on course in advanced techniques to study food-biyofilms. 14-21 September 2014. **1200 Euro Scholarship.**
- İpek D. ve Zorba N. N., 2013. Biyofilm Risk in Turkish Dairy Industry. Poster Presentation. 3 rd. European Congress on Microbial Biyofilms-Basic and Clinical Aspects, Eurobiyofilm2013. September 9-12, 2013. Ghent, Belgium
- VIII. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu (*Applied Molecular Microbiology Course*). Ulusal Moleküler Biyoloji Referans Laboratuvarı (*National Molecular Biology Reference Laboratory*). 24-28 June 2013. Ankara, Turkey.
- İpek, D., Özatay, Ş., Şentürk, E., 2012. Determination of Dairy Companies' Problems in The Ezine Region. Poster Presentation. 23 rd. International ICFMH Symposium, FoodMicro2012 Global Issues in Food Microbiology. 3-7 September, 2012. Istanbul-TURKEY
- İpek, D., Zorba N. N., 2012. Effects of Production Stages on Turkish Delight or Lokhum Poster Presentation. 23 rd. International ICFMH Symposium, FoodMicro2012 Global Issues in Food Microbiology. 3-7 September, 2012. Istanbul-TURKEY.

- Zorba N. N., İpek D., Bayram A., 2009. Kaşar Peyniri Üretim Hattı Microflorasının Belirlenmesi (*Identification of The Kashar Cheese Process Line Microflora*). Poster Presentation. Turkey 3. National Veterinary Food Hygiene Congress. 14-16 May, Bursa, Turkey.
- Zorba N. N., İpek D., 2008. Implementation of Hazard Analysis at Critical Control Points-The HACCP System-to Tahin Helva. 2nd Workshop Microbial Risk Management in Food Processes October 13-15, DTU, LYNGBY, DENMARK
- Zorba M., İpek D., 2008. Risk Analyses and Risk Management in The Food Industry. 2nd Workshop Microbial Risk Management In Food Processes October 13-15, DTU, LYNGBY, DENMARK.
- İpek D., Zorba N. N., 2008. Ülkemiz Piyasalarında Satılan Lokumların Mikrobiyolojik Kalitesi (*Microbiological Quality of Turkish Delight Sold in Turkish Markets*). Oral Presentation. 19. National Biology Congress. KTÜ, 23-27 June, Trabzon, Turkey.
- Rapid Methods in Microbiology. Workshop. Istanbul Technical University, 28-30 May 2007, Istanbul, Turkey.
- İpek D., Zorba M., 2007. Gıda Endüstrisinde Risk Analizi ve Yönetimi (*Risk Analyses and Management in Food Industry*). Poster Presentation. 5.th Food Engineering Congress. 8-10 September Ankara, Turkey.
- İpek D., Zorba N. N., 2007. Tahin Helvasında Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi (HACCP) Sisteminin Uygulanması (*HACCP Implementation on Tehina Halvah Process Line*) Poster Presentation. 5.th Food Engineering Congress. 8-10 September Ankara, Turkey.

c) Katıldığı Projeler

- Zorba N.N., Kweon J.H., İpek D., 2016-2017. Applicability of Ezine Cheese Process Lines Disinfection By New Technologies: Antibiofilm-Antiquorum Sensing Agents. Çanakkale Onsekiz Mart University Scientific Researching Commission. ID 908.
- Zorba N.N., İpek D., 2014-2015. Ezine Peyniri Üretim Hattında *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* ve *Listeria spp.*'nin Biyofilm Oluşturma

Kapasitesi. Çanakkale Onsekiz Mart University Scientific Researching Commission.  
FBA- 332.

Özatay Ş., İpek D., 2011-2012. Ezine Meslek Yüksekokulu'na Bağlı Gıda Analiz Laboratuvarı Kurulumu (Implementation of Ezine Vocational School Food Analyses Laboratory). Güney Marmara Kalkınma Ajansı (*South Marmara Development Agency*). Balıkesir, Çanakkale, Turkey.

Zorba N.N., İpek D., 2007-2009. Üretim Aşamaları ve Farklı Ambalajlama Tekniklerinin Lokum Kalitesine Etkisi (*Effects of Production Stages and Different Packaging Techniques on Turkish Delight/Lokum Quality*). Çanakkale Onsekiz Mart University Scientific Researching Commission. (M.Sc Thesis)

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

- T.C. Ziraat Bankası Biga Şubesi Servis Asistanı 2009-2010
- T.C. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Ezine Meslek Yüksekokulu Öğretim Görevlisi 2010- Devam Ediyor.
- Konkuk Üniversitesi / Çevre Mühendisliği Bölümü Misafir Araştırmacı 2016-2016

## **İLETİŞİM**

E-posta Adresi :dilvinipek@comu.edu.tr