

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINDA  
VİRÜLENS FAKTÖRLERİN VE BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN  
BELİRLENMESİ

Hacer Aslan Canberi

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Pınar Şanlıbaba

Şubat

2022

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hacer Aslan Canberi

İmzası

## ONAY

Doç. Dr. Pınar Şanlıbaba danışmanlığında Hacer Aslan Canberi tarafından hazırlanan bu çalışma 28/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hami Alpas

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ömer Şimşek

İmza:

Üye: Doç. Dr. Pınar Şanlıbaba

İmza:

Üye: Doç. Dr. Nefise Akçelik

İmza:

Üye: Doç. Dr. Başar Uymaz Tezel

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

### Gıdalardan İzole Edilen *Listeria monocytogenes* Suşlarında Virülens Faktörlerin ve Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

Hacer Aslan Canberi

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Pınar Şanlıbaba

Ankara ve yakın çevresindeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen toplam 180 adet izolasyon materyali, ISO 11290-1 protokolü takip edilerek *Listeria* spp. varlığı bakımından taranmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal olarak muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanan 61 izolata 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. Suşların 29'u *L. monocytogenes*, 18'i *L. innocua*, 9'u *L. grayii* ve 5'i *L. welshimeri* olarak tanımlanmıştır. *L. monocytogenes* varlığı bakımından tüketime hazır gıdalar en riskli gıda grubu olarak belirlenmiştir. Virülens gen bölgeleri varlığı açısından değerlendirilen 29 *L. monocytogenes* suşunun hiçbirinde *fla* genine ait bant bölgesi görülmemiştir. Suşların %72,4'ünde *prfA*, %69'unda *iap*, %48,3'ünde *hlyA*, %34,5'inde *inlA*, %24,2'sinde *fbp* ve %10,3'ünde ise *actA* gen bölgesi varlığı saptanmıştır. *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm üretme yetenekleri 24 h, 48 h ve 72 h süreyle araştırılmış ve her üç inkübasyon süresi sonunda da HL31, HL76 ve HL98 suşları güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. Paslanmaz çelik kuponlarda ve 96 kuyucuklu mikropalak ortamlarında 48 h ve 72 h'lik inkübasyon süreleri sonunda oluşan biyofilm yapısı üzerinde PAA ve QAC'nin etkinlik düzeyleri farklı konsantrasyonlarda (%0,1, %0,2 ve %0,3), farklı sürelerde (90 ve 120 saniye) ve farklı sıcaklık derecelerinde (25°C ve 37°C) test edilmiştir. Paslanmaz çelik kuponlarda en etkili dezenfektan olarak PAA saptanırken, mikropalak ortamlarında dezenfektanlar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Her iki ortamda da PAA ve QAC'nin 37°C'de %0,3 düzeyindeki uygulama dozunun en etkin eradikasyonu sağladığı istatistiki olarak tespit edilmiştir.

2022, 199 sayfa

**Anahtar kelimeler:** *Listeria monocytogenes*; gıda; toplum sağlığı; biyofilm; virülens; dezenfektan.

## ABSTRACT

PhD Thesis

Determination of Virulence Factors and Biofilm Forming Properties in Strains of *Listeria monocytogenes* Isolated From Food

Hacer Aslan Canberi

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Pınar Şanlıbaba

A total of 180 samples obtained from supermarkets, street markets and food vendors in and around Ankara were screened for *Listeria* spp., following the ISO 11290-1 protocol. 16S rRNA sequence analysis was performed on 61 isolates identified as probable *Listeria* spp. on the basis of their morphological and biochemical properties. Of those, 29 were identified as *L. monocytogenes*, 18 as *L. innocua*, 9 as *L. grayii* and 5 as *L. welshimeri*. In terms of *L. monocytogenes* positivity, ready-to-eat foods were determined as the food group with the highest risk. The 29 *L. monocytogenes* strains detected were evaluated for virulence genes, and no band corresponding to the *fla* gene was observed in any of them. While the *prfA* gene was found positive in 72.4% of the strains, *iap* was detected in 69%, *hlyA* in 48.3%, *inlA* in 34.5%, *fbp* in 24.2%, and *actA* in 10.3%. Biofilm producing capabilities of *L. monocytogenes* strains were investigated for 24 h, 48 h and 72 h, and HL31, HL76 and HL98 strains were defined as strong biofilm producers for all three biofilm formation periods. The efficacy of PAA and QAC disinfectants against biofilm structures formed on stainless steel coupons and in 96 microplate wells for 48 h and 72 h was tested at different concentrations (0.1%, 0.2% and 0.3%), for different durations (90 and 120 seconds) and at different temperatures (25°C and 37°C). While PAA was found to be the most effective disinfectant against biofilms formed on stainless steel coupons, no statistically significant difference was found between the disinfectants in terms of effectiveness against biofilms formed in microplate wells. It has been statistically determined that PAA and QAC disinfectants applied at a concentration of 0.3% at 37°C provide the most effective eradication in both environments.

2022, 199 pages

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; food; public health; biofilm; virulence; disinfectant.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin gerek ders gerekse tez döneminde destek ve yardımlarını benden esirgemeyen, rehberliğiyle doktora eğitimimi tamamlamamı sağlayan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar Şanlıbaba'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Tez çalışmasının gelişiminde bilgilerini, tecrübelerini ve desteklerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Nefise Akçelik (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) ve Sayın Doç. Dr. Başar Uymaz Tezel'e (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu),

Tez çalışmamı yürütebilmem için laboratuvarının kapılarını bana açan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mustafa Akçelik'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Esra Şentürk, Gülsüm Atasoy, Meryem Kocadağ, Seda Seyirt, Simge Aktop ve Zehra Tuğçe Toprak'a, Yardımlarından dolayı Elif Gamze Has' a,

Desteklerinden dolayı Gözde Ertüzün Kurugül ve Gizem Sonugür' e,

Yardımlarını esirgemeyen Volkan Aslan ve Melike Dinççelik Aslan'a,

Destek ve yardımlarından dolayı Burak Canberi' ye,

Eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan anneme ve babama,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ETİK BEYAN .....</b>                                            | <b>i</b>   |
| <b>ONAY .....</b>                                                  | <b>ii</b>  |
| <b>ÖZET.....</b>                                                   | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                              | <b>iv</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>                                               | <b>v</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                           | <b>vi</b>  |
| <b>SEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                       | <b>xi</b>  |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>                                     | <b>xii</b> |
| <b>SİMGELER DİZİNİ .....</b>                                       | <b>xvi</b> |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                              | <b>1</b>   |
| <b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>                                   | <b>4</b>   |
| 2.1. <i>LISTERIA</i> SPP.'NİN GENEL ÖZELLİKLERİ .....              | 4          |
| 2.2. <i>LISTERIA</i> SPP.' NİN SINIFLANDIRILMASI .....             | 4          |
| 2.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....                           | 9          |
| 2.4. LİSTERİYÖZİS .....                                            | 9          |
| 2.5. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> İÇİN YASAL DÜZENLEMELER .....   | 11         |
| 2.6. <i>LISTERIA</i> SPP.'NİN GIDALARDAN İZOLASYONU .....          | 13         |
| 2.7. GIDALARDA <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RİSKİ.....            | 15         |
| 2.8. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ' İN VİRÜLENS ÖZELLİKLERİ ..... | 19         |
| 2.9. BİYOFİLM OLUŞUMU .....                                        | 21         |
| 2.9.1. BİYOFİLM OLUŞUM AŞAMALARI.....                              | 22         |

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9.2. BİYOFİMLERİN GIDA SANAYİ AÇISINDAN ÖNEMİ .....                                       | 26        |
| 2.9.3. BİYOFİLM VARLIĞINI TESPİT ETME YÖNTEMLERİ .....                                      | 28        |
| 2.9.3.1. <i>In-Vitro</i> Yöntemler .....                                                    | 28        |
| 2.9.3.2. <i>In-Vivo</i> Yöntemler .....                                                     | 30        |
| 2.9.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ' TE BİYOFİLM OLUŞUMU.....                             | 30        |
| 2.9.5. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'TE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN MOLEKÜLER DOĞASI.....          | 32        |
| 2.9.6. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNU ÖNLEME STRATEJİLERİ..... | 35        |
| <b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>                                                       | <b>44</b> |
| <b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>                                                    | <b>46</b> |
| <b>4.1. MATERYAL.....</b>                                                                   | <b>46</b> |
| 4.1.1. GIDA ÖRNEKLERİ .....                                                                 | 46        |
| 4.1.2. KONTROL BAKTERİLERİ.....                                                             | 46        |
| 4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASALLAR.....                                 | 46        |
| 4.1.4. STOK KÜLTÜRLERİN HAZIRLANMASI .....                                                  | 46        |
| <b>4.2. YÖNTEM.....</b>                                                                     | <b>47</b> |
| 4.2.1. <i>LISTERIA</i> SPP. İZOLASYONU.....                                                 | 47        |
| 4.2.2. İZOLATLARIN MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI .....                     | 49        |
| 4.2.2.1. Gram Boyama.....                                                                   | 49        |
| 4.2.2.2. Katalaz Testi.....                                                                 | 49        |
| 4.2.2.3. Oksidaz Testi.....                                                                 | 49        |
| 4.2.2.4. Hareketlilik Testi .....                                                           | 49        |



|                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.2.5. <i>Listeria</i> spp. İzolatlarının Stoklarının Alınması .....                                                                                                                                                                  | 50 |
| 4.2.3. <i>LISTERIA</i> SPP. İZOLATLARININ MOLEKÜLER DÜZEYDE<br>TANIMLANMASI .....                                                                                                                                                       | 50 |
| 4.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....                                                                                                                                                                                                    | 50 |
| 4.2.3.2. 16S rRNA Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile<br>Çoğaltılması.....                                                                                                                                             | 52 |
| 4.2.3.3. 16S rRNA Gen Bölgelerinin Agaro Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi .....                                                                                                                                                      | 52 |
| 4.2.3.4. PZR Ürünlerinin Dizilenmesi ve Değerlendirilmesi .....                                                                                                                                                                         | 53 |
| 4.2.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN<br>BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ.....                                                                                                                                          | 54 |
| 4.2.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> Suşlarında Genomik DNA İzolasyonu .....                                                                                                                                                          | 54 |
| 4.2.4.2. Virülens Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması.....                                                                                                                                                    | 54 |
| 4.2.4.3. Virülens Gen Bölgelerinin Agaro Jel Elektroforezinde Varlığının<br>Görüntülenmesi.....                                                                                                                                         | 55 |
| 4.2.5. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞTURMA<br>ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ .....                                                                                                                                    | 55 |
| 4.2.6. PERASETİK ASİT VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN GÜÇLÜ<br>BİYOFİLM ÜRETİCİSİ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARI ÜZERİNDE<br>ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....                                                                  | 57 |
| 4.2.6.1. <i>Listeria monocytogenes</i> Suşlarının Paslanmaz Çelik Kuponlar Üzerinde Biyofilm<br>Oluşturma Özelliği ve Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Biyofilm<br>Hücreleri Üzerinde Etkinliğinin Belirlenmesi..... | 57 |
| 4.2.6.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> Suşlarının Paslanmaz Çelik Kuponlar Üzerinde<br>Biyofilm Oluşturma Özelliği.....                                                                                                               | 57 |

|                                                                                                                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.6.1.2. Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşan Biyofilm Tabakası Üzerinde Etkinliğinin Belirlenmesi.....                                      | 59         |
| 4.2.6.2. <i>Listeria monocytogenes</i> Suşlarının 96 Kuyucuklu Mikroplaklarda Oluşan Biyofilm Yapısı Üzerine Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Etkinliğinin Belirlenmesi..... | 60         |
| 4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....                                                                                                                                                            | 61         |
| <b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>                                                                                                                                                              | <b>63</b>  |
| 5.1. <i>LISTERIA</i> SPP. İZOLASYONU .....                                                                                                                                                      | 63         |
| 5.2. <i>LISTERIA</i> SPP. İZOLATLARININ MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI .....                                                                                                    | 69         |
| 5.3. <i>LISTERIA</i> SPP. İZOLATLARININ 16S rRNA DİZİ ANALİZİ İLE MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI .....                                                                                          | 73         |
| 5.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ.....                                                                                               | 77         |
| 5.5. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİ.....                                                                                                                  | 87         |
| 5.6. PERASETİK ASİT İLE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARDAKİ BİYOFİLM ÜRETİCİSİ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ....           | 89         |
| 5.7. PERASETİK ASİT İLE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN 96 KUYUCUKLU MİKROPLAKLARDA OLUŞAN BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....                                             | 112        |
| <b>6. TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>120</b> |
| 6.1. ÖRNEKLERDEN <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> İZOLASYONU .....                                                                                                                                 | 120        |
| 6.2. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ.....                                                                                               | 125        |

|                                                                                                                                                              |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>6.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....</b>                                                        | <b>128</b>        |
| <b>6.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIĞININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİ İLE KIYASLANMASI.....</b>                     | <b>130</b>        |
| <b>6.5. PERASETİK ASİT VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARDAKİ CANLI BİYOFİLM HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....</b> | <b>131</b>        |
| <b>6.6. PERASETİK ASİT VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN 96 KUYUCUKLU MİKROPLAKLARDA OLUŞAN BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....</b>    | <b>132</b>        |
| <b><u>7. SONUÇ.....</u></b>                                                                                                                                  | <b><u>134</u></b> |
| <b><u>KAYNAKLAR.....</u></b>                                                                                                                                 | <b><u>137</u></b> |
| <b><u>EKLER.....</u></b>                                                                                                                                     | <b><u>174</u></b> |
| <b>EK 1. TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA KULLANILAN KİMYASALLAR, BESİYERLERİ, KATKILAR, MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR .....</b>                  | <b>174</b>        |
| <b><u>ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>                                                                                                                                 | <b><u>176</u></b> |
| <b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>                                                                                                                     | <b><u>180</u></b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Biyofilm gelişiminin aşamaları.....                                                                          | 26 |
| Şekil 4.1. ISO 11290-1 yöntemi akış şeması .....                                                                        | 48 |
| Şekil 4.2. Tez çalışmasında kullanılan paslanmaz çelik kupon (uzunluk 2,5 cm, genişlik 0,8 cm ve yükseklik 0,1 cm)..... | 57 |
| Şekil 5.1. ALOA agar üzerinde muhtemel <i>Listeria</i> spp. izolatlarının koloni morfolojisi ...                        | 63 |
| Şekil 5.2. PALCAM agar üzerinde muhtemel <i>Listeria</i> spp. izolatlarının koloni morfolojisi .....                    | 64 |
| Şekil 5.3. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>actA</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....  | 80 |
| Şekil 5.4. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>fbp</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....   | 81 |
| Şekil 5.5.. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>iap</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....  | 82 |
| Şekil 5.6. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>hlyA</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....  | 83 |
| Şekil 5.7. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>prfA</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....  | 84 |
| Şekil 5.8. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>inlA</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....  | 85 |
| Şekil 5.9. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>fla</i> geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü.....   | 86 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. <i>Listeria</i> spp.'ye ait tür ve alt türler .....                                                                   | 6  |
| Çizelge 2.2. <i>Listeria</i> spp. cinsi üyelerinin ortak atalar bakımından gruplandırılması .....                                  | 7  |
| Çizelge 2.3. <i>Listeria</i> sensu strictu ve <i>Listeria</i> sensu lato grupları ve türler .....                                  | 7  |
| Çizelge 2.4. Evrimsel süreçte <i>Listeria</i> spp. serotiplerinin sınıflandırılması .....                                          | 8  |
| Çizelge 2.5. <i>L. monocytogenes</i> suşlarının neden olduğu gıda kaynaklı salgınlar .....                                         | 11 |
| Çizelge 2.6. <i>Listeria</i> spp. izolasyonunda kullanılan protokoller .....                                                       | 14 |
| Çizelge 2.7. <i>L. monocytogenes</i> 'te biyofilmden sorumlu genler .....                                                          | 35 |
| Çizelge 4.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım .....                                                               | 52 |
| Çizelge 4.2. Virülens gen bölgelerini saptamak için kullanılan primer dizileri.....                                                | 54 |
| Çizelge 5.1. Tez çalışması kapsamında <i>Listeria</i> spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler .....                      | 65 |
| Çizelge 5.2. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....                                                            | 71 |
| Çizelge 5.3. <i>Listeria</i> spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlaması.....                 | 74 |
| Çizelge 5.4. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında gen bölgelerinin varlığının araştırılması .                                  | 79 |
| Çizelge 5.5. <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarının 24 h, 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üretim kapasiteleri ..... | 88 |
| Çizelge 5.6. Çelik kuponlar üzerinde 48 h ve 72 h sonunda oluşan biyofilm üreticisi suş sayıları .....                             | 90 |

|                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 5.7.</b> HL76 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL) .....                                     | 92  |
| <b>Çizelge 5.8.</b> HL98 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL) .....                                     | 93  |
| <b>Çizelge 5.9.</b> HL31 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL) .....                                     | 94  |
| <b>Çizelge 5.10.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL) ..... | 95  |
| <b>Çizelge 5.11.</b> HL76 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm <sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri .....                                                                   | 96  |
| <b>Çizelge 5.12.</b> HL98 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm <sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri .....                                                                   | 97  |
| <b>Çizelge 5.13.</b> HL31 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm <sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri .....                                                                   | 98  |
| <b>Çizelge 5.14.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm <sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri .....                                | 99  |
| <b>Çizelge 5.15.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarının PAA uygulamasından sonra pozitif kontrollerine göre logaritmik azalma değerleri (log KOB/cm <sup>2</sup> ).....                                      | 100 |
| <b>Çizelge 5.16.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarının QAC uygulamasından sonra pozitif kontrollerine göre logaritmik azalma değerleri (log KOB/cm <sup>2</sup> ).....                                      | 101 |
| <b>Çizelge 5.17.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında PAA ve QAC uygulaması sonucunda elde olunan azalma düzeyleri üzerine etki eden faktörlere ilişkin ANOVA sonuçları .....                              | 102 |
| <b>Çizelge 5.18.</b> PAA ve QAC uygulamalarına göre <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması .....                                                                 | 103 |

|                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 5.19.</b> Uygulanan sıcaklık düzeylerine göre <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                | 103 |
| <b>Çizelge 5.20.</b> PAA ve QAC'nin uygulama dozuna göre <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                | 103 |
| <b>Çizelge 5.21.</b> PAA ve QAC'nin uygulama sürelerine göre <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması .....                           | 104 |
| <b>Çizelge 5.22.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                                                            | 104 |
| <b>Çizelge 5.23.</b> PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerinin biyofilm yapısında görülen azalma düzeylerine etkisinin ortalama miktarlarının karşılaştırılması .....                        | 105 |
| <b>Çizelge 5.24.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması .....    | 105 |
| <b>Çizelge 5.25.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında PAA ve QAC uygulamaları sonucunda görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                  | 106 |
| <b>Çizelge 5.26.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında PAA ve QAC uygulamalarına ait farklı doz seviyelerinin azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                              | 107 |
| <b>Çizelge 5.27.</b> Farklı sıcaklık uygulamaları ile PAA ve QAC'nin uygulanma doz seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde gözlemlenen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması ..... | 108 |
| <b>Çizelge 5.28.</b> 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında PAA ve QAC uygulamasından sonra 48 h'lik biyofilmlerin OD sonuçları .....                                                        | 113 |
| <b>Çizelge 5.29.</b> 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında PAA ve QAC uygulamasından sonra 72 saatlik biyofilmlerin OD sonuçları .....                                                      | 114 |
| <b>Çizelge 5.30.</b> PAA ve QAC uygulamasından sonra HL76 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları.....                                                              | 115 |

|                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 5.31.</b> PAA ve QAC uygulamasından sonra HL98 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları.....                              | 115 |
| <b>Çizelge 5.32.</b> PAA ve QAC uygulamasından sonra HL31 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları.....                              | 116 |
| <b>Çizelge 5.33.</b> PAA ve QAC uygulamasından sonra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları..... | 116 |
| <b>Çizelge 5.34.</b> PAA ve QAC uygulaması sonucuna göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                                 | 117 |
| <b>Çizelge 5.35.</b> Suş türlerine göre ortalama azalma miktarlarının (%) karşılaştırılması.....                                                              | 117 |
| <b>Çizelge 5.36.</b> Uygulanan sıcaklık derecelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                                | 117 |
| <b>Çizelge 5.37.</b> PAA ve QAC'nin uygulanma doz seviyelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                      | 117 |
| <b>Çizelge 5.38.</b> PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                      | 118 |
| <b>Çizelge 5.39.</b> Farklı inkübasyon sürelerinde biyofilm tabakalarının ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması.....                                | 118 |



## SİMGELER DİZİNİ

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| µg              | Mikrogram        |
| µL              | Mikrolitre       |
| µm              | Mikrometre       |
| cm <sup>2</sup> | Santimetre kare  |
| °C              | Santigrat derece |
| g               | Gram             |
| Dakika          | dk               |
| h               | Saat             |
| kb              | Kilobaz          |
| mL              | Mililitre        |
| +               | Pozitif          |
| -               | Negatif          |
| β               | Beta             |
| %               | Yüzde            |
| log             | Logaritma        |
| pH              | Asitlik derecesi |
| ppm             | Milyonda bir     |
| UV              | Ultraviyole      |
| kHz             | Kilohertz        |
| W               | Watt             |
| mg              | Milligram        |
| A               | Adenin           |
| G               | Guanin           |
| C               | Sitozin          |
| T               | Timin            |
| V               | Volt             |
| nm              | Nanometre        |
| cm              | Santimetre       |
| spp.            | Species          |
| vd.             | Ve diğerleri     |

|      |                                                                                                |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KOB  | Koloni oluşturan birim                                                                         |
| rRNA | Ribozomal ribonükleik asit                                                                     |
| LIP  | <i>Listeria</i> Patojenite Adası ( <i>Listeria</i> Pathogenicity Island)                       |
| EFSA | Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (European Food Safety Authority)                                  |
| AB   | Avrupa Birliği                                                                                 |
| CDC  | Hastalık Kontrol ve  nleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)                |
| FDA  | Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)                               |
| USDA | ABD Tarım Bakanlığı (US Department of Agriculture)                                             |
| ISO  | Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization)    |
| IDF  | Uluslararası Süt Federasyonu (International Dairy Federation)                                  |
| LLO  | Listeriolizin O                                                                                |
| WASP | Wiscott-Aldrich Sendromu Proteinini                                                            |
| EPS  | Ekstraselüler Polimerik Madde                                                                  |
| CF   | Kistik fibroz (Cystic Fibrosis)                                                                |
| DNA  | Deoksiribonükleik asit                                                                         |
| eDNA | Hücre Dışı DNA                                                                                 |
| CLSM | Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy)                         |
| QS   | Quorum Sensing                                                                                 |
| SEM  | Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)                                    |
| TEM  | Geirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy)                               |
| MTT  | Metil tetrazolyum tuzu                                                                         |
| XTT  | Tetrazolyum tuzu                                                                               |
| TTC  | 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium klorür                                                           |
| INT  | 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolium                                       |
| PZR  | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                                                    |
| mPZR | Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multiplex Polymerase Chain Reaction)                   |
| qPZR | Gerçek Zamanlı/Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Polymerase Chain Reaction) |

|                                 |                                                                                    |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| ATCC                            | Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)                 |
| GMP                             | İyi Üretim Uygulaması (Good Manufacturing Practice)                                |
| HACCP                           | Kritik Kontrol Noktasında Tehlike Analizi (Hazard Analysis Critical Control Point) |
| PAA                             | Perasetik asit                                                                     |
| QAC                             | Kuarterner Amonyum Bileşiğı                                                        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Hidrojen Peroksit                                                                  |
| NaClO                           | Sodyum Hipoklorit                                                                  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sodyum bisülfid                                                                    |
| LAB                             | Laktik Asit Bakterisi                                                              |
| BHI                             | Brain Heart Infusion                                                               |
| TSYE                            | Tryptone Soya Yeast Extract                                                        |
| LEB                             | <i>Listeria</i> Enrichment Broth                                                   |
| NCBI                            | National Center for Biotechnology Information                                      |
| BLAST                           | Basic Local Alingment Search Tool)                                                 |
| PBS                             | Phosphate-Buffered Saline                                                          |
| OD                              | Optik Dansitite (Optical Density)                                                  |
| UVM                             | University of Velmont                                                              |
| RNA                             | Ribonükleik asit                                                                   |

## 1. GİRİŞ

*Listeria monocytogenes*, insan ve hayvanlar için patojen bir mikroorganizmadır (1). *L. monocytogenes* hava, su ve toprakta bulunabilen, yüksek ve düşük pH ve sıcaklıklarda gelişebilen, dondurma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz çevre koşullarında bile canlılığını koruyabilen halk sağlığı açısından önemli bir patojendir (2). *Listeria* türleri arasında *L. monocytogenes* en sık görülen patojen olmakla beraber, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* de insanlar için patojen olan türler arasında kabul görmektedir (3,4). *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketimi sonucu görülen listeriyozis; sağlıklı bireylerde bile grip benzeri semptomlara ve gastroenterite neden olabilmektedir. Bununla beraber *L. monocytogenes* enfeksiyonu açısından özellikle hamileler ve bağışıklığı baskılanmış bireyler büyük risk taşımaktadır. Listeriyozis bu bireylerde menenjit, ensefalit, sepsisemi, endokardit gibi klinik tablolara; hamilelerde ise düşüklere, ölü veya erken doğuma neden olabilmektedir (5). *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketiminden yaklaşık 10-12 h sonunda ateş, yorgunluk, baş ağrısı, kusma, diyare gibi semptomlar oluşmaktadır. Menenjit, ensefalit, sepsisemi gibi daha ciddi klinik tablolar ise 10-70 gün arasında ortaya çıkmaktadır (6,7). Listeriyozis, 1930'lerden itibaren insan sağlığını tehdit eden bir hastalıktır. Ancak 1980'lerde Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülen çeşitli salgınlar listeriyozisi yeniden gündeme getirmiştir. İlk listeriyozis salgın vakası, 1981 yılında Kanada'da kontamine lahana salatasının tüketilmesi sonucunda ortaya çıkmış; daha sonrasında ise farklı pek çok gıda kaynaklı *L. monocytogenes* salgınları rapor edilmiştir. Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC), listeriyozis salgınlarını inceleyerek yıl bazında kayıt altına almaktadır (8). Salgınlara prevalansındaki artış ve geniş gıda yelpazesinin listeriyozise aracılık etmesi *Listeria* spp. ile ilgili araştırmaların günümüzde daha da artmasına neden olmuştur (9-12). Ülkemizde ise listeriyozis salgınları sistematik olarak kayıt altına alınmadığından, ilgili verilere maalesef ulaşılamamıştır.

Farklı gıdalarda bu patojenin prevalansını belirleyen araştırmalar yapılmasına rağmen, işletmeler bazında *L. monocytogenes*'in prevalansı belirleyen çalışma sayısı ise sınırlıdır (13). Bu patojenin gıda üretim tesislerinde ve gıda hazırlama ekipmanlarında da bulaşma neden olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, *L. monocytogenes*'in kontaminasyonunu azaltabilecek önlemlerin alınması toplum sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Benzer şekilde ülkemizde *L. monocytogenes* prevalansına odaklanan

alışmalar, bu suşların virölens özelliklerinin belirlemesi konusunda yetersizdir. Virölens gen bölgelerinin varlığının belirlenmesi, özellikle listeriyozis tedavisinde hedef alınabilecek kriterler olmaları bakımından oldukça önemlidir.

*L. monocytogenes* suşları geniş pH ve sıcaklık aralıkları, yüksek tuz konsantrasyonları ve düşük oksijen seviyelerinde bile gelişebilmektedir. Bununla birlikte bakterinin biyofilm oluşturabilme özelliklerine sahip olduğu da bilinmektedir (14). Biyofilm, mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere yapışması sonucu oluşan son derece koordine bir yapıdır. *L. monocytogenes* gibi patojenik bakteriler, gıda işleme ekipmanlarındaki biyofilmlerden gıdalara taşınarak birçok hastalığa yol açabilirler (15). Biyofilm mikroorganizmalara antibiyotiklerden, dezenfektanlardan ve kimyasallardan korunma gibi birçok avantaj sağlamaktadır (16). Gıda üretim tesisi ve ekipmanlarının uygun ve yeterli temizlenmemesi, yüzeylerde organik madde birikimine neden olmaktadır. Bu durum mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını kolaylaştırarak biyofilm oluşumunu desteklemektedir. Mikroorganizmalar yüzeylere tutunduktan sonra kendi ürettikleri ekstrasellüler matriks (EPS) içine gömülürler ve ardından geri dönüşümsüz bir hale gelerek biyofilmi oluştururlar (17). Biyofilmler; gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakta, gıda güvenliği, kalitesi ve üretim verimini azaltmakta birlikte, gıda üretim ekipmanlarında tıkanma ve bozulmalara da neden olabilmektedir. Ayrıca biyofilm yapıları diğer gıda ürünlerinin işlenmesi sırasında çapraz kontaminasyonlara da neden olabilmektedir. Bu durum halk sağlığı ve gıda sanayi açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle, oluşabilecek biyofilmlere karşı önlemlerin alınması ve oluşan biyofilmin ortamdaki uzaklaştırılması için uygun önleme stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu kapsamda öncelikli olarak amacımız; Ankara ve çevre ilçelerden temin edilen gıda örnekleri ile gıda üretim yerlerinden temin edilen atık su, yıkama suyu, yüzeylerden alınacak swap örnekleri gibi materyallerin *L. monocytogenes* varlığı bakımından taranmasıdır. 16S rDNA dizi analizleri ile moleküler tanımlaması yapılacak olan izolatların;

1. Virölens gen bölgelerini içerip içermediğinin belirlenmesi,
2. İzole edilen suşların biyofilm oluşturma profillerinin fenotipik olarak belirlenmesi,

3. Virölens gen bölgesi içirme oranı ile biyofilm oluşturma özelliği arasındaki korelasyonun belirlenmesi,
4. Güçlü biyofilm üreticisi olarak saptanan suşların seçilerek, bunların farklı sıcaklık ve depolama sürelerinde biyofilm oluşturma özelliğinin araştırılması,
5. Gıda sanayinde CIP sisteminde yaygın olarak kullanılan bazı dezenfektanların seçilmesi suretiyle, işletmelerde uygulanan CIP süreçlerinin standart prosedürleri de dikkate alınarak, bunların farklı konsantrasyonlarda ve farklı uygulama sürelerinde biyofilm üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *LISTERIA* SPP.'NİN GENEL ÖZELLİKLERİ

*Listeria* spp. Gram pozitif, fakültatif anaerop, 0,5 µm çapında ve 1-2 µm uzunluğunda, köşeleri yuvarlak çubuk şekilli, spor oluşturmeyen, kapsülsüz bir cinstir. *Listeria* türleri geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilme özelliğine sahiptir. Bu cinsin üyeleri (-1,5)–(+45)°C arasında canlılığını sürdürebilmekte olup, optimum gelişme sıcaklıkları ise 30-37°C arasındadır. Ancak (-18) ve (-40)°C’de bile *Listeria* türlerinin canlılıklarını koruyabildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (18,19). *Listeria* spp. 4-6 adet peritrik flagellaya sahip olduğundan 20-25°C’de hareketli olup, 35-37°C’de hareketsizdirler. Bunun nedeni ise, flagellanın yapısında bulunan ve *flaA* geni aracılığıyla kodlanan FlaA proteininin transkripsiyonun 30°C’de durmasıdır (20).

*Listeria* spp. doğada saprofit olarak canlılığını sürdürebilmektedir. Gıda üretim tesisleri ve üretim atıklarından, topraktan, su ve atık sulardan, çeşitli gıda maddelerinden, insan ve hayvan dışkıları gibi çeşitli çevresel kaynaklardan sıklıkla izole edilebilmektedir (1). *Listeria* spp. 65°C ve üzerindeki ısı işlemlerinde canlılıklarını koruyamamaktadır. pH gelişim aralığı ise 3-12’dir. Ancak optimal gelişim olarak hafif bazik ortamları daha çok talep ederler. Ortamdaki %10 tuz konsantrasyonunu rahatlıkla tolere edebilirler. *Listeria* cinsi içinde patojen özellikleri ile ön plana çıkan *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türleri β-hemolitik aktivite gösterirken; bu cinsin diğer üyeleri β-hemolitik aktivite göstermemektedir (2,21).

### 2.2. *LISTERIA* SPP.’NİN SINIFLANDIRILMASI

*Listeria* spp. üyeleri başlangıçta *Corynebacteriaceae* familyasında yer alan *Kurthia* cinsi altında sınıflandırılmıştır. Daha sonraları 16S rRNA dizi analizi çalışmaları sonucunda, *Listeria* cinsi *Lactobacillus-Bacillus* dalı içinde ayrı bir takson olarak gruplandırılmıştır. 2001 yılından itibaren ise *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımı, *Listeriaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır. Taksonomik olarak en yakın olduğu cins *Listeriaceae* familyasının bir diğer üyesi olan *Brochothrix*’tir (22). Çeşitli fenotipik ve genotipik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda; *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi Gram (+) bakterilerle benzerlik göstermektedir (23–25).

1985 yılından önce *Listeria* cinsi içinde *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. grayi* olmak üzere altı farklı tür tanımlanmıştır. *L. innocua* ve *L. monocytogenes*, gıdalardan en yaygın olarak izole edilen türlerdir (26). Bu türlerden sadece *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* patojenik özellik gösterirken; *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. grayi* patojenik özellik göstermemektedir. Daha sonraları yedinci bir tür olarak *L. murrayi* tanımlanmış olsa da Rocourt tarafından 1992 yılında bu tür, *L. grayi*'nin bir alt türü olarak sınıflandırılmıştır (21). Ayrıca *L. denitrificans* türü, önceleri *Listeria* cinsi içinde tanımlanmış, ancak 1987 yılında bu tür *Jonesia denitrificans* olarak yeni bir cins içine dâhil edilmiştir (24).

Günümüzde, *Listeria* cinsi içinde tanımlanmış 27 farklı tür ve 6 alt tür bulunmaktadır (27) (Çizelge 2.1.).



**Çizelge 2.1.** *Listeria* spp.'ye ait tür ve alt türler

| <b>Türler</b>                                              | <b>Kaynak</b> |
|------------------------------------------------------------|---------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>                              | (28)          |
| <i>Listeria innocua</i>                                    | (29)          |
| <i>Listeria seeligeri</i>                                  | (30)          |
| <i>Listeria welshimeri</i>                                 | (30)          |
| <i>Listeria ivanovii</i>                                   | (29)          |
| <i>Listeria grayi</i>                                      | (30)          |
| <i>Listeria marthii</i>                                    | (31)          |
| <i>Listeria rocourtiae</i>                                 | (32)          |
| <i>Listeria fleischmannii</i>                              | (33)          |
| <i>Listeria weihenstephanensis</i>                         | (34)          |
| <i>Listeria aquatica</i>                                   | (35)          |
| <i>Listeria cornellensis</i>                               | (35)          |
| <i>Listeria floridensis</i>                                | (35)          |
| <i>Listeria grandensis</i>                                 | (35)          |
| <i>Listeria riparia</i>                                    | (35)          |
| <i>Listeria booriae</i>                                    | (36)          |
| <i>Listeria newyorkensis</i>                               | (36)          |
| <i>Listeria goaensis</i>                                   | (37)          |
| <i>Listeria costaricensis</i>                              | (38)          |
| <i>Listeria kielensis</i>                                  | (39)          |
| <i>Listeria thailandensis</i>                              | (40)          |
| <i>Listeria valentina</i>                                  | (41)          |
| <i>Listeria rustica</i>                                    | (42)          |
| <i>Listeria portnoyi</i>                                   | (42)          |
| <i>Listeria immobilis</i>                                  | (42)          |
| <i>Listeria farberi</i>                                    | (42)          |
| <i>Listeria cossartiae</i>                                 | (42)          |
| <b>ALT TÜRLER</b>                                          |               |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>            | (30)          |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>        | (30)          |
| <i>Listeria fleischmannii</i> subsp. <i>fleischmannii</i>  | (33)          |
| <i>Listeria fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i> | (43)          |
| <i>Listeria cossartiae</i> subsp. <i>cayugensis</i>        | (42)          |
| <i>Listeria cossartiae</i> subsp. <i>cossartiae</i>        | (42)          |

Filogenetik analiz çalışmaları değerlendirildiği zaman patojenik olan ve olmayan *Listeria* türleri arasında akrabalık dereceleri açısından farklı yakınlıklar bulunduğu belirtilmektedir (44–46). Akrabalık derecesi göz önünde bulundurulduğunda *Listeria* cinsi 4 farklı gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar ve gruplar içerisine dâhil olan *Listeria* türleri Çizelge 2.2.’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** *Listeria* spp. cinsi üyelerinin ortak atalar bakımından gruplandırılması

| Grup       | <i>Listeria</i> spp.                                                                                                                                                 |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I</b>   | <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. marthii</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. ivanovii</i>                                    |
| <b>II</b>  | <i>L. fleischmannii</i> , <i>L. aquatica</i> , <i>L. floridensis</i>                                                                                                 |
| <b>III</b> | <i>L. rocourtiae</i> , <i>L. weihenstephanensis</i> , <i>L. cornellensis</i> , <i>L. grandensis</i> , <i>L. riparia</i> , <i>L. booriae</i> , <i>L. newyorkensis</i> |
| <b>IV</b>  | <i>L. grayi</i>                                                                                                                                                      |

Farklı bir araştırma grubu tarafından ise *Listeria* spp. türleri *Listeria sensu strictu* ve *Listeria sensu lato* olarak iki farklı gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.3.). Araştırmacılar, *Listeria sensu strictu* içinde sınıflandırılan türlerin hepsinin ortak atadan türediğini, patojen özellikteki atanın virülens genlerini kaybetmesi ve/veya bu genlerde meydana gelen delesyon ya da mutasyonlarla bu genlerin işlevsizleşmesi sonucu yeni türlerin oluştuğunu bildirmişlerdir (47).

**Çizelge 2.3.** *Listeria sensu strictu* ve *Listeria sensu lato* grupları ve türler

| Gruplar                              | <i>Listeria</i> spp.                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Listeria sensu stricto</i></b> | <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. marthii</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. ivanovii</i>                                                                                                                            |
| <b><i>Listeria sensu lato</i></b>    | <i>L. fleischmanni</i> , <i>L. weihenstephanensis</i> , <i>L. rocourtiae</i> , <i>L. aquatica</i> , <i>L. cornellensis</i> , <i>L. riparia</i> , <i>L. floridensis</i> , <i>L. grandensis</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. newyorkensis</i> , <i>L. booriae</i> |

*Listeria* spp. türlerinde *Listeria* Patojenite Adası (*Listeria* Pathogenicity Island / LIPI) olarak isimlendirilen bölgede, patojeniteden sorumlu genler yer almaktadır (48). *Listeria sensu lato* grubunda sınıflandırılan türlerin hiçbirinde LIPI1 (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) ve LIPI2 (*inlA*, *inlB*) gen bölgelerinin bulunmadığı, bu nedenle de bu grupta yer alan

türlerin patojenik özellik göstermediği bildirilmiştir (49). Bununla beraber *Listeria sensu strictu* grubunda yer alan tüm türlerin, virülens genleri kodlayan dört genomik lokusa sahip olduğu saptanmıştır (50–54). Bu lokuslar;

**a) *Listeria* Patojenite Adası 1 (LIPI-1):** *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* genlerinden oluşmaktadır ve bu genler hücreler arası motiliteden ve hücre içi sağkalımdan sorumludur.

**b) *inlAB* lokusu:** *InlA* ve *inlB* genlerini kodlamaktadır. Bu yüzey proteinleri, konakçı hücrelerin istilasına aracılık etmektedir.

**c) *inlC* lokusu:** *InlC* genini kodlamaktadır. Bu gen bakterinin hücreden hücreye yayılımından sorumludur.

**d) LIPI- 4 lokusu:** LIPI-4 lokusu konak hücre istilasını arttırabilme özelliğine sahip, nöral ve plesantal listeriyozise neden olabilen, fosfotransferaz sistemlerini (PTS) kodlayan altı gen içermektedir. Bu lokus hipervirülensten sorumludur.

*Listeria* spp. suşlarının sahip oldukları antijenik çeşitlilik nedeniyle, kendi aralarında farklı serotiplere/serovaryetelere ayrılmaktadır. *Listeria* spp. türleri somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri gibi çoklu yüzey işaretçilerini taşımaktadır. *Listeria* spp. somatik antijenlerine göre 15 alt gruba ayrılırken (I-XV), flagellar antijenlerine göre de dört alt grupta (A-D) sınıflandırılmaktadır (55). *Listeria* spp. H ve O antijenlerine göre ise 16 farklı serotipe sahiptir (1,21,56). Moleküler alt tipleme teknikleri kullanılarak *Listeria* spp. serotiplendirme açısından farklı filogenetik gruplara ayrılmıştır (57). Soylar olarak sınıflandırılan serotipler Çizelge 2.4.'te yer almaktadır. Soy I ve Soy II içerisinde sınıflandırılan serotipler, insanlarda klinik tablolara neden olmaktadır. Soy I epidemik salgınlara yol açarken, Soy II gıda kaynaklı suşlarla, Soy III ve IV ise hayvanlarda bulunan suşlarla ilişkilendirilmiştir (49,58).

**Çizelge 2.4.** Evrimsel süreçte *Listeria* spp. serotiplerinin sınıflandırılması

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| <b>Soy I</b>   | 1/2b, 3b, 3c, 4b, 4d, 4e |
| <b>Soy II</b>  | 1/2a, 1/2c, 3a, 3c       |
| <b>Soy III</b> | 4a, 4c                   |
| <b>Soy IV</b>  | 4a, 4c                   |

### 2.3. LISTERIA MONOCYTOGENES

*Listeria* spp. türleri arasında üzerinde en fazla araştırma yapılan tür *L. monocytogenes*'dir. Bu patojen ilk olarak 1881 yılında Alman hastalardan alınan numunelerden izole edilmiş ve sonrasında ise 1911 yılında İsveç'te tavşan ciğerinden, 1925 yılında ise Almanya'da koyunlardan izole edilmiştir. *L. monocytogenes*, 1926 yılında da Murray, Webb ve Swann tarafından Cambridge'deki bir laboratuvarında hasta tavşanlardan izole edilmiş olup, taksonomik sınıflandırmada diğer cinslerle benzer özellik göstermediği ve mononükleer lökositoya sebep olduğu için *Bacterium monocytogenes* olarak isimlendirmişlerdir. 1927'de Pirie izole etmiş olduğu tür için, antiseptik cerrahinin erken bir savunucusu olan İngiliz cerrah Sir Joseph Lister'e (1827-1912) ithafen bu tür için *Listerella hepatolytica* ismini önermiştir. Murray ve arkadaşları ile Pirie'nin farklı tarihlerde birbirlerinden bağımsız olarak izole edip isimlendirdikleri bakteriler araştırmacılar tarafından Lister Enstitüsü'ne gönderilmiştir. Burada, bakteri örneklerinin benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiş ve araştırmacılar tarafından bu bakteri *Listerella monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Pirie, 1939 yılına kadar *Listerella* isminin daha önceden bir küf türünün adlandırılmasında kullanıldığını fark etmemiştir. Bu küf ismi de 1906 yılında Jahn tarafından benzer şekilde Lister'e atfedilmiştir. Bu hatalı isimlendirme nedeniyle 1940 yılında bakterinin ismi, *Listeria monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (50,59–62).

### 2.4. LISTERİYOZIS

Listeriyozis, insan ve hayvanlarda görülen, sıklıkla da hamilelik döneminde uterus, merkezi sinir sistemi veya kan dolaşım sistemini etkileyen önemli bir hastalıktır. İnsanlarda görülen listeriyozis vakalarının birincil etmeni olarak *L. monocytogenes* bilinse de *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* kaynaklı vakalar da nadiren rapor edilmektedir. Ruminantlarda (inek, koyun vd.) gözlenen vakalarda ise başlıca sorumlunun *L. monocytogenes* olmasının yanı sıra enfeksiyonların yaklaşık %10'unun *L. ivanovii*'den kaynaklandığı bildirilmektedir. Listeriyozis vakalarından sorumlu olan *L. monocytogenes* serotipleri çoğunlukla 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b olarak tespit edilmiş olsa da, büyük boyutlu salgınlara sebep olan serotipin 4b olduğu bilinmektedir (63–66).

*L. monocytogenes*, çok çeşitli hücre tiplerini enfekte etme ve bağırsak, kan-beyin ile plasenta bariyerlerini geçme yeteneğine sahip hücre içi bir bakteridir (67). İnsanlarda

görülen listeriyozis vakalarının tamamı kontamine gıda ürünlerinin tüketimi ile bağlantılıdır (68,69). Hastalık etmeni olan patojenin vücuda alınması ile birlikte, hastalarda yüksek ateş, mide krampları, kusma, halsizlik ve ishal gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır (4). Bazı listeriyozis vakaları hafif ve kendi kendini sınırlayan, ağır olmayan grip benzeri semptomlarla atlatılabilirken, bazı vakalarda ise menenjit, sepsisemi, düşük yapma veya ölü doğum, perinatal enfeksiyonlar, gastroenterit, ensefalit, beyin absesi ve serebrit ile ilişkilendirilmiş daha ağır tablolar ortaya çıkabilmektedir (26). Hamileler, yeni doğanlar, yaşlılar, immün sistemi baskılanmış bireyler, organ transplantasyonu yapılan hastalar ve malignitesi olan yetişkinler, listeriyozis bakımından yüksek risk taşımaktadır (7).

Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu'na (EFSA: European Food Safety Authority) göre Avrupa Birliği'nde (AB) yılda 1300 listeriyozis vakası görülürken, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC: Centers for Disease Control and Prevention) Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 1600 vakanın olduğunu rapor etmektedir (8,70).

Listeriyozisin, invaziv ve invaziv olmayan iki farklı formu bulunmaktadır. İnvaziv olmayan listeriyozis immün sistemi sağlam bireylerde diyare, ateş, baş ağrısı ve kas ağrısı gibi semptomlarla seyretmektedir. Hastalık *L. monocytogenes*'in gıdalar aracılığıyla yüksek dozlarda vücuda alınması sonucu ortaya çıkmakta ve belirtiler birkaç gün içerisinde kendini göstermektedir. İnvaziv listeriyozis ise daha ağır klinik belirtilere neden olmakta ve popülasyondaki riskli bireyleri etkilemektedir. Bu tür enfeksiyonlar %20-30 oranında mortaliteyle sonuçlanmaktadır. CDC, listeriyozisin kontamine gıda kaynaklı hastalığa neden olan en önemli üçüncü etken olduğunu bildirmiştir. Hastalık kontamine gıda aracılığıyla patojenin vücuda alınmasını takiben genellikle 1-2 hafta içerisinde ortaya çıkmakta, bazen bu süre 90 güne kadar uzayabilmektedir (8,71,72).

Listeriyozis vakalarının büyük bir kısmının kontamine olmuş süt ve süt ürünleri, kırmızı et ve kanatlı eti, deniz ürünleri, taze meyve ve sebzeler ile tüketime hazır gıdalardan kaynaklandığı rapor edilmektedir (1,4,23,73). Gıdada başlangıç *L. monocytogenes* yükü oldukça düşük olsa bile, gıda içeriğinin mikroorganizma gelişimini desteklemesi ve patojenin buzdolabı koşulları altında bile gelişebilme yeteneğinin olması listeriyozis bakımından risk oluşturmaktadır (1).

*L. monocytogenes* suşlarının neden olduğu listeriyozis salgınları, salgının kaynağı olarak saptanan gıdalar ile vaka ve ölüm sayıları CDC raporları esas alınarak 2015 yılından itibaren Çizelge 2.5.’ de özetlenmiştir (8).

**Çizelge 2.5.** *L. monocytogenes* suşlarının neden olduğu gıda kaynaklı salgınlar

| Yıl  | Gıda Kaynağı      | Vaka Sayısı | Ölüm Sayısı | Ülke      |
|------|-------------------|-------------|-------------|-----------|
| 2021 | Beyaz peynir      | 12          | 1           | İspanya   |
|      | Şarküteri eti     | 3           | 1           | -         |
| 2020 | Şarküteri eti     | 12          | 1           | New York  |
|      | Mantar            | 36          | 4           | Çin       |
| 2019 | Haşlanmış yumurta | 8           | 1           | Gürcistan |
|      | Şarküteri eti     | 10          | 1           | -         |
| 2018 | Domuz eti         | 4           | 0           | İspanya   |
|      | Şarküteri eti     | 4           | 1           | İspanya   |
| 2017 | Yumuşak peynir    | 8           | 2           | ABD       |
| 2016 | Donmuş sebze      | 9           | 3           | ABD       |
|      | Çiğ süt           | 2           | 1           | ABD       |
|      | Paketli salata    | 19          | 1           | ABD       |
| 2015 | Yumuşak peynir    | 30          | 3           | ABD       |
|      | Dondurma          | 10          | 3           | ABD       |

## 2.5. LISTERIA MONOCYTOGENES İÇİN YASAL DÜZENLEMELER

Güvenilir gıda kavramı gıdaların fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan ortaya çıkabilecek her türlü riskten arındırılmış olması gerekliliğine işaret etmektedir. Biyolojik risk, gıda maddesinin mikrobiyel açıdan sağlık kriterlerine uygun koşulları sağlamadığının göstergesidir (66,74)

Çiğ ve tüketime hazır gıdalar, satışa sunulmadan önce, belirlenmiş kriterlere uygunluk açısından değerlendirilmektedir. Halihazırda Avrupa’da, Avrupa Birliği 2073/2005 sayılı “Gıda Maddeleri İçin Mikrobiyolojik Kriterler” standartları uygulanmaktadır. Avrupa Komisyonu tarafından belirlenmiş olan bu kriterlere göre (75) :

- Bebekler ve özel tıbbi ürünler için geliştirilen tüketime hazır gıdalarda, raf ömrü süresince 25 g gıda maddesinde *L. monocytogenes* bulunmamalıdır.
- *L. monocytogenes*'in gelişimini desteklemeyen, bebeklere ve özel tıbbi amaçlara yönelik olarak hazırlanmış tüketime hazır gıdalar dışında kalan diğer tüketime hazır gıdalarda da raf ömrü süresince 25 g gıda maddesinde *L. monocytogenes* bulunmamalıdır.

1985 yılında ABD ve İsviçre’de *L. monocytogenes* bulaşmış yumuşak peynir ürünlerinin tüketilmesine bağlı ölümlerin görülmesi, bu bakteriye özel bir önem verilmesine neden olmuştur (30,50). 1990’lı yıllarda görülen deli dana hastalığı ile birlikte AB’nde gıda güvenliği ve tüketicinin korunması ile ilgili mevzuatlar oluşturulmaya başlanmıştır. Bu hastalık bir bakıma; gıda güvenliği ve tüketicinin korunması açısından dönüm noktası olmuştur. Bu krizlerle beraber çeşitli mevzuatların oluşturulması ve/veya var olan mevzuatlarda değişikliğe gidilmesinin gerekliliği anlaşılmıştır. Bu bağlamda atılan ilk adım gıda hukuku genel prensibine dayanan ‘Yeşil Doküman’ın yayınlanmasıdır. Bu dokümanın 4 ana hedefi vardır (76):

- Mevzuatın tüketicilerin, üreticilerin, imalatçıların ihtiyaçlarını karşılayıp karşılamadığını belirlemek,
- Gıda güvenliği ile ilgili önlemlerin yeterli olup olmadığını belirlemek,
- Gıda mevzuatı için kamuoyu oluşturmak,
- Gerekli durumlarda uygun önlemler teklif edilmesini sağlamak.

Ülkemizdeki yasal sınırlandırmalar ise ilgili kurumlarca düzenlenmiştir. Bu kapsamda “Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği”nde belirtilen şekilde yasal sınırlandırmalar uygulanmaktadır. İlgili yönetmelikte krema (pastörize), kaymak, peynir (eritme peynir dışındaki peynirler), eritme peynirler, dondurma ve sütlü buz, fermente ürünler (sucuk vb.), ısıl işlem görmüş et ürünleri, işlenmiş çift kabuklu yumuşakçalar, kabuklular, karından bacaklılar, kafadan bacaklılar, havyar, pizza, hamur ve hamur bazlı ürünler, tartlar ve yaş pastalar, paketlenmiş ve dondurulmuş sebzeler, tüketime hazır meyve ve sebze suları, tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler, bebek formülleri ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarının 25 g / 25 mL’inde *L. monocytogenes* bulunmamalıdır (77).

## 2.6. *LISTERIA* SPP.'NİN GIDALARDAN İZOLASYONU

Gıdalarda *Listeria* spp. varlığının belirlenmesi için oluşturulmuş çeşitli standart yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler birbirlerinin yerine kullanılabilmeyle beraber, bazı gıdalarda özellikle belirli protokollerin takip edilmesi önerilmektedir. Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration / FDA), ABD Tarım Bakanlığı (US Department of Agriculture-Food and Safety / USDA-FSIS) ve Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization / ISO) gibi çeşitli denetleme ve düzenleme kurumları tarafından hazırlanan bu protokoller, bakterinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak tanımlanmasını öngörmektedir (4,78). Bu protokollerde, *Listeria* spp.'nin gıdalardan izole edilmesi sırasında kullanılan besiyerleri ve protokol basamakları birbirinden bazı farklılıklar göstermektedir. Yöntemlerin bazılarında ön zenginleştirme aşaması uygulanırken, bazılarında ise bu aşama uygulanmamaktadır. *Listeria* spp. izolasyonunda kullanılan yöntemler Çizelge 2.6.'da özetlenmiştir (79–83).



**Çizelge 2.6.** *Listeria* spp. izolasyonunda kullanılan protokoller

| Yöntem             | Ön Zenginleştirme Aşaması | Kullanılan Besiyeri                                                                                                                                             | Kullanıldığı Gıda Maddesi                                 | Tespit sınırı                      |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>FDA</b>         | Var                       | LEB broth (Ön zenginleştirme besiyeri)<br>OXFORD agar<br>PALCAM agar<br>MOX agar<br>LPM agar                                                                    | Deniz ürünleri,<br>meyve ve sebze,<br>süt ve süt ürünleri | <1 KOB/mL                          |
| <b>ISO 11290-1</b> | Var                       | Yarı konsantrasyon Fraser broth (Ön zenginleştirme besiyeri)<br>Tam konsantrasyon Fraser broth (Selektif zenginleştirme besiyeri)<br>OXFORD agar<br>PALCAM agar | Tüm gıda türleri                                          | 25 gram gıda örneğinde<br><1 KOB/g |
| <b>USDA</b>        | Var                       | UVM agar (Ön zenginleştirme besiyeri)<br>Fraser broth (Selektif zenginleştirme besiyeri)<br>MOX agar<br>TSA-YE gar                                              | Kırmızı et, kümes hayvanları, yumurta                     | <1 KOB/g                           |
| <b>IDF</b>         | Var                       | LEB (Ön zenginleştirme besiyeri)<br>PALCAM agar<br>Selektif zenginleştirme besiyeri)<br>OXFORD agar<br>TSA-YE agar                                              | Süt ve süt ürünleri                                       | <1 KOB/mL                          |

*Listeria* türlerini tespit etmek için uygulanan bu protokoller, çoklu seçici zenginleştirme aşamalarını takiben biyokimyasal tanımlama ve serotipleme gibi basamakları içermektedir.

Bu çalışmaların sonuçlanması bazen birkaç günü bulmakta ve bu da zaman kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle, *Listeria* türlerinin tespitinde, sonuçlanma sürelerini kısaltan bir dizi alternatif moleküler yöntemlerin varlığı günümüzde önem kazanmıştır (84). Bu yöntemlerde *Listeria* spp.'ye özgü spesifik genler kullanılmaktadır (81,85,86). *Listeria* spp. tanımlanmasında genellikle tüm bakterilerde evrensel gen bölgesi olarak kabul edilen 16S rRNA gen bölgesi analizi öncelikli olarak yapılmaktadır. Ayrıca *groESL*, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *hlyA*, *prs*, *iap*, *flaA* ve *fbp* gibi gen bölgelerinin varlığının tanımlanması da *Listeria* spp.'nin tanımlanmasında kullanılan diğer önemli gen bölgeleridir. Bu gen bölgelerinin araştırılması ile tür düzeyinde hızlı ve güvenilir tanımlamalar yapmak mümkün olabilmektedir (21,87). Ayrıca; *L. ivanovii* için liv22-228 bölgesi, *L. seeligeri* için lse24-315 bölgesi, *L. innocua* için lin0464 ve lin2483 bölgeleri, *L. welshimeri* için lwe7-571 bölgesi ve *L. grayi* için lgr20-246 bölgesi türe özgü tanımlamada kullanılan diğer gen bölgeleridir (21).

## 2.7. GIDALARDA *LISTERIA MONOCYTOGENES* RİSKİ

Listeriyozis vakalarında en çok aracılık eden gıdalar arasında çiğ ve pastörize süt, yumuşak peynir, dondurma, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, salatalar, çiğ veya tütülenmiş balık, kabuklu deniz ürünleri, tüketime hazır gıdalar, kıyma ve tavuk eti sayılabilir (88,89).

Gıdaların *L. monocytogenes* ile kontamine olmasında aşağıda belirtilen noktalar önem taşımaktadır (10,14,90);

- i) Kontamine olmuş hammaddenin kullanımı,
- ii) Gıdalara yetersiz ısıtma işlem uygulanması,
- iii) Üretim hattındaki ekipmanların yüzeyinden çapraz kontaminasyonun gerçekleşmesi,
- iv) Üretim tamamlandıktan sonraki aşamalarda (olgunlaştırma, paketleme, depolama, taşıma vb.) kontaminasyonun gerçekleşmesi.

*L. monocytogenes* ile gıda maddelerinin kontamine olmasının önüne geçebilmek için WHO ve CDC tarafından tavsiye edilen ve aşağıda belirtilen hijyen kurallarına mutlaka dikkat edilmesi gerekmektedir (8,72);

- i) Çiğ kırmızı veya kanatlı etle temas öncesi ve sonrası eller sıcak suyla ve uygun dezenfektanlı sabunla iyice yıkanmalıdır.

- ii) Hayvansal kökenli gıdalar iyice pişirilmelidir.
- iii) Sebze ve meyveler yenmeden önce iyice yıkanmalıdır.
- iv) Pastörize edilmemiş süt veya bu sütlerden yapılan gıdalar tüketilmemelidir.
- v) *Listeria* spp. soğukta da üreyebilen bir bakteri olduğundan buzdolapları ve soğuk odalar düzenli olarak temizlenip, dezenfekte edilmelidir.
- vi) Tüketime hazır veya çabuk bozulan gıdalar mümkün olan en kısa sürede tüketilmelidir.

*L. monocytogenes* ile kontamine olma riski bakımından tüketime hazır gıdalar ön sıralarda yer almaktadır. Bu tarz gıdalar, herhangi bir ek işleme gerek duyulmadan kolayca hazırlanabilen gıdalar olduğundan dolayı, genellikle çalışan kesim tarafından çok fazla tercih edilmektedir (91,92). Tüketime hazır gıdaların *L. monocytogenes* gelişimini destekler nitelikte olması, *L. monocytogenes*'in bu tür gıdalardan elimine edilmesini zorlaştırmaktadır (1,93,94).

Indrawattana ve ark. (2011) tarafından Bangkok'ta 104 adet çiğ et örneğinde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranını belirlemek amacıyla analiz yapılmıştır. Araştırmacılar örneklerin 22 tanesinden *L. monocytogenes* izole etmişler ve bu izolatların hepsinin 4b serotipinde olduğunu tespit etmişlerdir (95).

Tao ve ark. (2016) ise, Çin'in Nanjing kentindeki farklı süpermarketlerden ve geleneksel tarım ürünleri pazarlarından temin ettikleri toplam 200 farklı gıda örneğinde *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre hayvan eti örneklerinin %10,9'u (6/55), kümes hayvanı örneklerinin %22'si (11/50) ve kabuklu deniz ürünleri örneklerinin %15'i (6/40), ahtapot örneklerinin %13,3'ü (4/30) ve tatlı su balığı örneklerinin %4'ü (1/25) olmak üzere toplam 28 örnek *Listeria* spp. açısından pozitif olarak tanımlanmıştır. Toplam 28 *Listeria* spp. izolatının 13 tanesi *L. monocytogenes*, 11 tanesi *L. innocua*, 2 tanesi *L. ivanovii* ve 3 tanesi *L. welshimeri* olarak belirlenmiştir (96).

Vongkamjan ve ark. (2016) Tayland'da tüketime hazır gıdalarda *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* prevelansını araştırmak için 122 adet deniz ürünü, 22 adet hayvansal ürün, 18 adet vejetaryen ürün, 15 adet şarküteri ürünü, 13 adet salata ve sebze ürünü, 4 adet tatlı, 2 adet yumurta bazlı ürün ve 4 adet diğer ürünler olmak üzere toplam 200 adet farklı gıda örneğini analiz etmişlerdir. Denemeye alınan 200 örneğin 15'i (%7,5) *L. monocytogenes* bakımından pozitif bulunmuştur. Farklı ürün grupları için *L. monocytogenes* bakımından

pozitiflik oranları ise; deniz ürünlerinde %3, hayvansal kökenli ürünlerde %1,5, vejetaryen ürünlerde %1 ve şarküteri et ürünlerinde %2 olarak tespit edilmiştir (97).

Luchansky ve ark. (2017) Aralık 2010 ve Mart 2013 tarihleri arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde perakende olarak satın aldıkları toplam 27.389 adet soğuk olarak tüketime sunulan gıdada *L. monocytogenes* varlığını analiz etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda ise 116 gıda ürünü *L. monocytogenes* bakımından pozitif bulunmuştur (98).

Amajoud ve ark. (2018) Fas'ın kuzey batısında yer alan Tetouan'da toplam 1096 gıda örneğinde *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. Test edilen örneklerin 80 tanesi (%7,3) *Listeria* spp. varlığı açısından pozitif bulunurken, izolatların 16'sı (%1,5) *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır (93).

Selvaganapathi ve ark. (2018) Hindistan'ın Tuticorin Sahili'ndeki balıkçı limanı, balık çıkarma merkezleri, deniz ürünleri işleme tesisleri, balık pazarı ve balık kütleme alanlarını içeren beş örnekleme alanında, farklı deniz ürünlerinin temas ettiği yüzeylerden sürüntü örnekleri toplamış ve *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. Çalışmada toplam 115 sürüntü örneği incelenmiş ve bu örneklerin %5,22'si *L. monocytogenes* açısından pozitif olarak belirlenmiştir (99).

Coradini ve ark. (2018) Hindistan'da çiğ sığır etinde, gıda ile temas eden ve etmeyen yüzeylerde *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. Toplam 84 örneğin altı tanesinde (%7,14) *L. monocytogenes* tanımlanmıştır. 7 adet çiğ sığır etinden alınan örneklerden 2 tanesinde, 56 adet gıda ile temas eden yüzeylerden alınan örneklerden 1 tanesinde ve 14 adet gıda ile temas etmeyen çalışma yüzeylerinden alınan örneklerden ise 3 tanesinde *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiştir (100).

Mashak ve ark. (2021) İran'daki marketlerde satılan deniz ürünlerinde *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. Bu amaçla toplam 350 adet deniz ürünü analiz edilmiştir. Bu çalışmada incelenen 350 numunenin 40 tanesi (%11,42) *Listeria* spp. varlığı açısından pozitif olarak bulunmuştur. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türlerinin dağılımı ise sırası ile %62,50, %20 ve %7,50 olarak saptanmıştır. Balık, karides, ıstakoz ve yengeç örneklerindeki *Listeria* spp. bakımından pozitiflik oranları ise sırasıyla %14, %12, %13 ve %8 olarak belirlenmiştir. Yine aynı örneklerdeki *L. monocytogenes* prevalansı sırasıyla %9, %6, %7 ve %6 olarak bulunmuştur (101).

Ülkemizde ise listeriyozis salgınları sistematik olarak kayıt altına alınmadığından dolayı, listeriyosiz verilerine ulaşım konusunda maalesef sıkıntılar yaşanmaktadır. Bununla beraber, ülkemizde çok sayıda çiğ ve tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* varlığının araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Aşağıda yapılan bazı çalışmalar kısaca özetlenmeye çalışılmıştır.

Akkaya ve ark. (2006) tarafından Afyonkarahisar’da yapılan bir çalışmada, 100 adet beyaz peynir örneği *L. monocytogenes* varlığı bakımından taranmıştır. Örneklerin 6 tanesinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bulunmuştur (102).

Özkaya ve ark. (2010) Kayseri’de açıkta satılan çiğ süt örneklerinde *Listeria* spp. varlığını araştırmak için Mayıs 2009-Eylül 2009 tarihleri arasında farklı sokak sütçüleri tarafından satılan toplam 50 adet çiğ süt örneğini analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, örneklerden 11’inin (%22) *Listeria* spp. ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların 6’sının (%12) *L. monocytogenes*, 3’ünün (%6) *L. ivanovii* ve 1’inin (%2) *L. seeligeri* olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan birinin ise tanımlaması yapılamamıştır (103).

Akkaya ve ark. (2016) Afyonkarahisar şehir merkezindeki pastanelerden 25 adet sade, 25 adet meyveli ve 25 adet çikolatalı olmak üzere toplam 75 adet kremalı pasta satın almışlar ve bunları *Listeria* spp. varlığı bakımından incelemişlerdir. Toplam 75 kremalı pasta örneğinin 10’unda (%13,33) *Listeria* spp. varlığı tanımlanmıştır. İzolatların 5’inin (%6,66) *L. monocytogenes*, 8’inin (%10,66) *L. innocua* ve 3’ünün (%4) ise *L. seeligeri* olduğu tespit edilmiştir (104).

Deniz (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise, Şanlıurfa semt pazarlarında satışa sunulan yöresel Urfa peynirlerinde *L. monocytogenes* varlığını tespit etmek için toplam 97 örnek incelenmiştir. Örneklerin 3 tanesinden (%3,09) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (82).

Gökmen ve ark.(2016) Balıkesir’deki süpermarketlerde satışa sunulan tüketime hazır gıdaları (et döner, tavuk döner, fermente sosis, kızarmış et, beyaz turşu, peynir, hoşmerim, helva, rus salatası, sebze salatası) *Listeria* spp. varlığı bakımından analiz etmişlerdir. Bu kapsamda toplam 235 tüketime hazır gıda örneğinin 22’sinde (% 9,4) *Listeria* spp. varlığı saptanmıştır. İzolatların 5’inin (%2,1) *L. monocytogenes* olduğu tanımlanmıştır (104).

Altun (2017), Şanlıurfa'nın Akçakale ve Eyyübiye ilçelerindeki işletmelerden temin ettiği 88 adet çiğ keçi sütü örneğini *Listeria* spp. varlığı açısından değerlendirmiştir. Örneklerin 4 tanesi *Listeria* spp. (%4,54) açısından pozitif olarak değerlendirilmiş ve bu izolatlardan 2 tanesinin (%2,27) ise *L. monocytogenes* olduğu tanımlanmıştır (105).

Şanlıbaba ve ark. (2018a) Ankara'da satışa sunulan 201 adet tüketime hazır gıdayı *L. monocytogenes* varlığı bakımından incelemiştir. Örneklerdeki *L. monocytogenes* prevalansı ise, %8,5 olarak saptanmıştır (106).

Altun ve Atasever (2018) tarafından Erzurum'da yapılan bir çalışmada ise, 60 adet tavuk etinin 14 tanesinin (%23,3) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (107).

Şanlıbaba ve ark. (2018b) tarafından Ankara'da bulunan market ve pazarlardan temin edilen 110 adet çiğ süt ve çeşitli süt ürünlerinde *Listeria* spp. varlığı araştırılmıştır. Toplamda 23 örnekte *Listeria* spp. varlığı tanımlanmış ve bu izolatların %4,55'i ise *L. monocytogenes* olarak belirlenmiştir (108).

Şahin ve ark. (2020) tarafından Sivas ilinde satılan çiğ inek (n=50) ve manda sütlerinde (n=50) *Listeria* spp. varlığı araştırılmıştır. Örneklerin 4'ünden (%4) *Listeria* spp. izole edilmiştir. İnek sütünden izole edilen izolatların hepsinin *L. grayi*, manda sütlerinden elde edilen izotların ise *L. seeligeri* (n=2) ve *L. grayi* (n=1) olduğu saptanmıştır. Çiğ süt örneklerinde *L. monocytogenes* varlığı saptanmamıştır (109).

## **2.8. LISTERIA MONOCYTOGENES' İN VİRÜLENS ÖZELLİKLERİ**

*L. monocytogenes* çeşitli konak hücre tiplerini enfekte etmeyi sağlayan, konak hücrede hayatta kalabilme şansını arttıran ve konak hücre içerisinde bakteri çoğalmasına izin veren bir dizi virülens faktöre sahiptir (110).

*L. monocytogenes* enfeksiyonunun ilk aşaması, bakterinin konak epitel hücrelerine tutunması ve konak hücre istilasıdır. Internalin A (*InlA*) ve internalin B (*InlB*), konak hücredeki E-kadherin yüzey reseptörlerine bağlanmak suretiyle fagositozu indükleyerek konakçı hücreler içerisine patojenin girişini modüle etmektedir. *InlA* sadece E-kadherin eksprese eden hücrelerde bakteri girişine izin verirken, *inlB*, E-kadherin reseptörü dışında farklı reseptörlere de sahip olduğu için farklı konak hücrelere girişine izin vermektedir (61,111,112).

*L. monocytogenes* konakçıya girdikten sonra, bakterinin sitozole ulaşması için konak hücre cevabından kaçması gerekmektedir. Bu kaçış, *hlyA* geni tarafından kodlanan listeriolizin O (LLO) proteini sayesinde gerçekleşmektedir. LLO, fagosit vakuolünün parçalanmasından ve *L. monocytogenes*'in vakuolden kaçmasından sorumludur. (21,81,113). LLO ayrıca histon modifikasyonu, mitokondriyel fizyon, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve lizozomal permeabilizasyonunda değişikliklere yol açmaktadır. Bu aktiviteler LLO'nun por oluşturabilme aktivitesinden ileri gelmektedir (111,114). Fosfolipaz A (*plcA*), fosfolipaz B (*plcB*), fosfolipaz C (*plcC*) ve metalloproteaz (*mpl*) genleri de *hlyA* geni ile beraber vakuoler kaçışa aracılık etmektedir (61,114).

Enfeksiyonun son aşamasında *L. monocytogenes*'in hücreden hücreye yayılımı gerçekleşmektedir. Hücreden hücreye yayılım, yüzey proteini *actA* ve *inlC* ile ilişkilidir. *ActA*, *L. monocytogenes* yüzeyinde bulunan bir transmembran proteinidir. Bu protein konakçıdaki “Wiscott-Aldrich sendromu proteinini (WASP)” fonksiyonel olarak taklit etmekte ve *arp2/3* aktin kompleksini bakteri yüzeyine alarak, aktin polimerizasyonunu indüklemektedir. Polimerize aktin filamentleri ve *inlC*'nin aktin bağlayıcı protein ile etkileşimi ise, bakterilerin hücreden hücreye yayılımını sağlamaktadır (61,115–117). *InlC* delesyonunun bakteriyel invazyon ve hücre içi proliferasyonunu etkilemediği, ancak polarize epitel hücrelerinde hücreden hücreye yayılmayı bozduğu bildirilmektedir. *InlC*, memeli adaptör proteini olan Tuba'ya bağlanmakta ve N-WASP ile etkileşimini önlemektedir. *InlC* tarafından Tuba-N-WASP etkileşiminin bozulması, hücre-hücre bağlantılarındaki kortikal gerilimi azaltmakta ve bakteri yayılmasını teşvik etmektedir (118,119).

*L. monocytogenes*, farklı çevresel koşullarda ve enfeksiyon sırasında hayatta kalma şansını artırmak için gen ekspresyonunu modüle etmektedir. *L. monocytogenes*'de virülens gen ekspresyonu, promotorun -35 bölgesinde bir konsensus bağlanma bölgesi olan CRP (cAMP reseptör proteini) ailesinin bir transkripsiyon faktörü olan *prfA* tarafından düzenlenmektedir. *PrfA*, virülens faktörlerinin transkripsiyonunu doğrudan düzenlemektedir (61,120)

## 2.9. BİYOFİLM OLUŞUMU

Biyofilm, hücre dışı polimerik madde (EPS, Extracellular Polymeric Substances) içerisinde organize olmuş mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu yapıdır. Bu topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi farklı tür mikroorganizmalardan da meydana gelebilmektedir. Biyofilm yapısı sayesinde mikroorganizmalar konak bağışıklığı, antimikrobiyel maruziyeti, çevresel stres (pH değişikliği, besin yetersizliği, vb.) gibi olumsuz çevre koşullarından korunabilmektedir (16,121,122).

Biyofilm kavramı çok eski zamanlardan günümüze gelmiştir. Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), yaptığı ilkel mikroskopta kendi diş eti ve ağzından aldığı örneklerde biyofilm yapısını gözlemlemiştir. İncelemelerinde mikroorganizmaların küme halinde bulunduğunu görmüştür. Louis Pasteur (1822-1895) ise, şarabın asidik yapıya dönmesinin nedenini araştırırken bakteri kümelerini gözlemleyerek, bu yapıyı resmetmiştir (123). Daha sonraki yıllarda biyofilm kavramının aydınlatılması için çalışmalar devam etmiştir. Heukelekian ve Heller, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye tutunması halinde, serbest halde bulunma durumuna göre daha hızlı çoğalabildiklerini rapor etmiştir. Zobell ise deniz suyunda yaşayan bakterilerde çoğalma karakteristiklerini kıyaslamış ve bakterilerin su içinde cam yüzeye tutunabildiklerini ve yüzeylere tutunan bu bakterilerin tutunmayan bakterilere göre hızlı çoğaldığını gözlemlemiştir (124–126).

Tıbbi alanda ise, biyofilm ilk kez 1970-1972 yıllarında, kronik *Pseudomonas aeruginosa* akciğer enfeksiyonu olan kistik fibrozlu (CF) hastalardan alınan balgam örneklerinin rutin Gram boyalı mikroskopik incelenmesi sırasında keşfedilmiştir. 1974-1978 yılları arasında yapılan otopsi serilerinde kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu nedeni ile ölen CF hastalarının akciğerleri incelenmiştir. 1977 yılında ise biyofilm görüntüsü yayınlanmış ve bol miktarda alginat ile çevrelenmiş kümeleşmiş bakterilerin (yığınların) kronik olarak *P. aeruginosa* mukoid suşları ile enfekte olan CF hastalarının balgamında görülebildiği gösterilmiştir (123). Costerton ve ark. (1974) ayrıca *P. aeruginosa* kolonilerini elektron mikroskobu ile incelediklerinde, bakterilerin birbirine ve yüzeye yapışması için bir “glikokaliks” yapısının gerektiğini fark etmişlerdir (127). Sonraki çalışmalarda “glikokaliks” yerine “biyofilm” terimi kullanılmaya başlanmıştır (128). 1995 yılında ise biyofilmlerin, mikroorganizmaların yüzeylere, ara yüzeylere ve birbirlerine tutunarak oluşturdukları mikroorganizma toplulukları olduğu belirtilmiştir (121).



19. yüzyılın başlarından itibaren biyofilm ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmış, farklı yüzeylerde gelişen biyofilmler ve bunların yapısı ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yüksek çözünürlüklü elektron mikroskoplarının kullanılmaya başlanması sayesinde, biyofilmlerin yapısal özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Biyofilmler hacmen yaklaşık %80-85 EPS ve %15-20 biyofilm hücrelerinden oluşmaktadır. Kimyasal ve fiziksel özellikler açısından değişiklik gösterebilmekle birlikte, EPS'nin ana bileşenleri polisakkaritler (homo- ve heteropolisakkaritler), proteinler ve hücre dışı DNA'dır. EPS, biyofilmin bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar ve farklı fonksiyonel görevlere sahiptir. EPS, su içeriği açısından zengin bir yapı olduğu için, bazı doğal biyofilmlerde kurumayı önleyebilir. Bununla beraber, antibiyotikler ve dezenfektanlar gibi toksik maddelerin hedeflerine ulaşmasını önleyen bir difüzyon bariyeri olarak da işlev görebilir (121,126).

### 2.9.1. BİYOFİLM OLUŞUM AŞAMALARI

Mikroorganizmaların planktonik durumdan, biyofilm oluşturdıkları duruma geçişleri yapılarında bir dizi değişiklikler meydana getirmelerine neden olmaktadır. Öncelikle biyofilm yapısının ilk aşaması olan adezyon için gerekli olan adezin ve hücre dışı matriks bileşenlerin oluşumu başlamaktadır (126). Hücre dışı polimerik matriks (EPS), hücrelere bağlanma yeri sağlamak ve yapısal iskelet görevi görmektedir. EPS, biyofilm içerisindeki hücrelerin çevresel koşullara ve konak hücre yanıtına karşı korumada bir kalkan görevi görmektedir. Bu durum, beta laktamaz eksikliği olan *Klebsiella pneumoniae* suşu tarafından oluşturulan biyofilmin ampisilin penetrasyonuna izin verdiğini gösteren bir çalışma ile doğrulanmıştır (129). Bunun nedeni, ampisilin yabani tip suşun oluşturduğu biyofilmin içine girmeden önce beta laktamaz tarafından hızla bozunmasıdır. EPS, yapıdaki toplam karbon içeriğinin %50-90'ını oluşturmakta olup; polisakkaritler, proteinler ve hücre dışı DNA (eDNA), su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içermektedir. Yapıdaki temel bileşen polisakkaritlerdir. Farklı mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin kimyasal içerikleri ve yapıları değişebilmekle beraber, yapıdaki temel özellikler korunmaktadır. Örneğin; bakteriyel ve fungal biyofilmlerin yapılarında yapısal özellik kaynaklı farklı bileşenler olabilmektedir. Bu bileşenlere ek olarak, dış zar proteinleri ve fimbria, pili ve flagella gibi çeşitli hücre uzantıları da biyofilm matrisinin bir parçası olarak işlev görebilmektedir (16,121,129-133).

Biyofilm oluşumu genel olarak 5 aşamada incelenebilir:

**a) Gevşek adezyon:** Tutunmanın ilk aşaması olarak bilinmekte ve bu esnada gerçekleşen olaylar fizokimyasal etkileşimlerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Hidrofobik etkileşimler, elektrostatik kuvvetler, Van der Waals etkileşimleri, sıcaklık ve pH gibi değişkenler bu aşamada belirleyicidir. Mikroorganizmaların türüne bağlı olarak flagella ve fimbriaların varlığının da tutunmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir (121,125) Bu aşama geri dönüşümlü bir aşamadır, yani mikroorganizmalar tutunma durumundan her an tekrar serbest duruma geçebilirler. Bu nedenle gevşek adezyon aşaması “geri dönüşümlü adezyon” ya da “primer adezyon” aşaması olarak da adlandırılır (125).

**b) Sıkı adezyon:** Gevşek adezyon aşamasından sonra reseptör ve/veya EPS’lerin devreye girdiği sıkı adezyon (geri dönüşümsüz adezyon) aşaması gerçekleşmektedir (125). Yüzeylere gevşek olarak tutunan bakteriler, duysal proteinlerinin uyarılması nedeniyle EPS üretmeye başlamaktadır. EPS içeriğinde bulunan çeşitli polisakkaritler, eDNA ve proteinler mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz bağlanmasını sağlamaktadır (16,134). Bu tutunma geri dönüşümsüz olarak gerçekleştiği için, bu aşamaya “geri dönüşümsüz adezyon” ya da “sekonder adezyon” aşaması da denilmektedir (125).

**c) Mikrokoloni oluşumu:** Sıkı adezyon aşamasında üretilmeye başlanan EPS miktarının daha kalın ve stabil bir duruma geldiği aşamadır. Biyofilm yapısındaki EPS miktarı artarken, diğer taraftan da hücreler kendi aralarında mikrokoloni yapıları oluşturmaya başlamaktadır. Heterojen biyofilm yapılarında ise, her tür kendi arasında bir araya gelerek mikrokoloniler oluşturmaktadır. Bu esnada, ortamda bulunan planktonik mikroorganizmalar da mikrokoloni yapılarına katılarak, yapının daha sağlam bir duruma gelmesine aracılık etmektedirler (16,122,135). EPS biyosentezi sürecinde çok sayıda enzim ve düzenleyici proteinler görev almaktadır. Bu süreçte enerji kaynağı olarak şekerler, azot kaynağı olarak ise amino asitler ve amonyum tuzları kullanılmaktadır. Açığa çıkan karbon (C) ve azot (N) oranı ise EPS’nin yapısını belirlemektedir. Maksimum EPS üretimi için en uygun C/N oranının 10/1 olduğu belirtilmiştir (136).

EPS’ler biyofilm matrislerinin önemli parçalarıdır ve içerdikleri polisakkaritlerin kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri, monomer birimlerinin türü, glikozidik bağların türü ( $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6) ve içerdikleri farklı organik ve inorganik bileşenlerden kaynaklı çeşitlilik

göstermektedir (130). Araştırmalar, polisakkaritlerin EPS yapısında yapısal olarak görev almasının yanında adezyondan da sorumlu olduğunu göstermektedir. Ma ve ark. (2006), *P. aeruginosa* suşlarında polisakkarit kodlayan *psl* operonunda bulunan *pslA* ve *pslB* genlerindeki mutasyonların biyofilm gelişiminin başlatılmasını olumsuz etkilediğini göstermişlerdir. Araştırma sonunda *psl*'nin hücre-yüzey etkileşiminde önemli bir rol oynadığı ve dolayısıyla da polisakkaritlerin adezyonda önemli olduğu ifade edilmiştir (137).

Su, biyofilm matrisinin yapısında bol miktarda bulunmaktadır. EPS matrisi biyofilmdeki hücrelerin su içeriklerindeki dalgalanmalara karşı tamponlama görevi gören yüksek derecede hidratlı bir ortam sağlamakta ve biyofilmi kuruluğa karşı dirençli hale getirmektedir. Birçok EPS higroskopiktir ve spesifik su bağlama mekanizmaları yerine entropik olarak suyu tuttuğu düşünülmektedir. EPS'nin, tamponlama mekanizmasının, olumsuz çevre koşullarında bakterileri koruduğu ileri sürülmektedir (138).

Protein ve eDNA gibi bileşenlerin EPS içerisindeki miktarları görece fazla olmasa da bu bileşenlerin önemli fonksiyonel görevleri olduğu bilinmektedir. eDNA'nın *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. gibi mikroorganizmalarda yüzeye tutunmayı ve biyofilm yapısının sağlamlığını etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. eDNA'nın ayrıca hücrelerin lizizi ve aktif sekresyon süreci ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir (139–141). Hücre yüzeyi proteinlerinin ise pili ve flagella ile birlikte yüzeylere tutunmaya katıldığı ve bazı mikroorganizmalarda, yüzeyler boyunca yer değiştirmeye dâhil olarak, yüzey kolonizasyonunu kolaylaştırdığı belirtilmektedir. EPS proteinleri ayrıca biyofilm yapısına ve stabilitesine de katkıda bulunmaktadır. Bu proteinlerde meydana gelen mutasyonların, biyofilm oluşumunda ile stabilitesinde azalmalara ve biyofilm mimarilerinin değişmesine neden olduğu gösterilmiştir (142).

**d) Biyofilmin olgunlaşması:** Mikrokoloniler arasında gaz alışverişi ve besin alımının sağlandığı, bununla beraber atık maddelerin dışarı atıldığı mikrokanalların olduğu evredir. Mikrokanallar biyofilme kubbeye benzeyen bir görüntü ve 3 boyutlu bir yapı kazandırmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ve lazer taramalı konfokal mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy: CLSM) uygulamasının mümkün olmasıyla, biyofilmlerin yüksek oranda EPS içerdikleri ve mikrokoloniler arasında kanallar içeren hidrate yapılar oldukları açığa çıkmıştır (121,125,129,131).

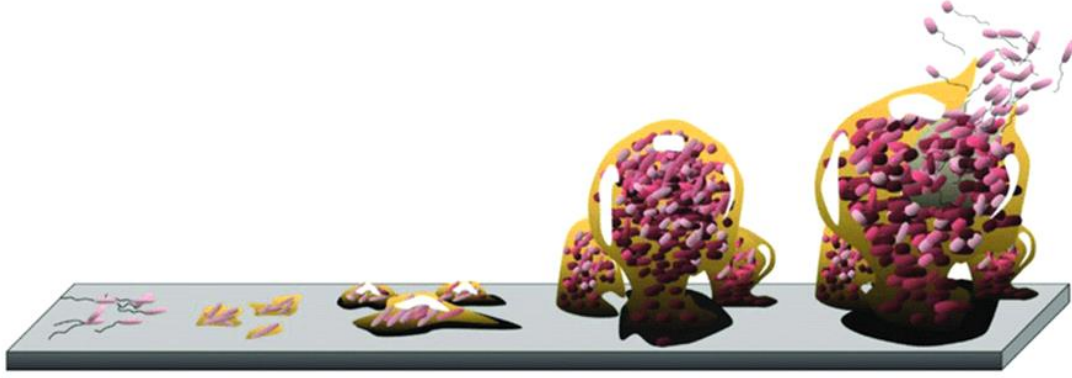
**e) Biyofilm hücrelerinin ayrılması:** Biyofilm gelişiminin son aşaması biyofilm yapısındaki hücrelerin yapıdan ayrılarak, yeniden planktonik forma geçmesidir. Bu aşama mikroorganizmanın hayatta kalma başarısına katkıda bulunmaktadır. Biyofilm içerisindeki hücrelerin gelişebilmesi, hücrelerin biyofilm içerisinde besin alımı ve atık madde uzaklaştırılması gibi süreçlere bağlıdır. Bununla beraber biyofilm gelişimi ve büyümesi, taşıyabileceği hücre yoğunluğu ile de doğrudan ilişkilidir. Biyofilmden hücrelerin ayrılması aktif bir süreçtir. Biyofilm dağılmasını sağlayan mekanizmalar; Quorum Sensing (QS) mekanizması, nükleotit bazlı ikinci haberci sinyal yolları ve küçük RNA düzenleyici yoldur. Biyofilmlerden aktif dağılım olgun biyofilm yapılarının merkezinde bulunan hücrelerin lokalize ölümü ve lizisi ile gerçekleşmektedir. Olgun biyofilmdeki hücrelerin heterojen doğası nedeniyle, yalnızca bir hücre alt popülasyonu lizise uğrayabilmektedir. Biyofilm yapısından ayrılan hücreler farklı yerlerdeki yüzeylere tutunarak orada yeni biyofilm yapıları meydana getirebilmektedirler (121,129,143,144).

**Quorum Sensing Mekanizması:** Biyofilm olgunlaşması esnasında biyofilm içerisindeki hücre popülasyonu da belirli bir yoğunluğa ulaşmakta ve sonrasında hücreler salgıladıkları sinyal molekülleri ile popülasyona özgü yanıtlar geliştirebilmektedir. Popülasyonda meydana gelen bu çok hücreli yanıt “QS mekanizması” olarak tanımlanmaktadır (122,145). QS mekanizması sayesinde hücre popülasyonu yoğunluğundaki dalgalanmalara yanıt olarak gen ifadesi düzenlenebilmektedir. Başka bir deyişle QS mekanizması, bakterilerin hücre yoğunluğu hakkında bilgi paylaşmasına ve gen ekspresyonunu buna göre ayarlamasına izin veren bir hücre-hücre iletişim sürecidir. Bu sistemin çeşitli mikroorganizmalarda beslenme, üreme, spor oluşumu, enzim salgılama, virülens ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli süreçleri düzenlediği bilinmektedir. QS sisteminin mekanizmaları mikroorganizmaya göre farklılık gösterebilmektedir. Gram (-) bakteriler Als adı verilen küçük sinyal moleküllerini kullanırken, Gram (+) bakteriler sinyal molekülü olarak otoindükleyici peptitleri (AIPs) kullanmaktadır (146–150).

Antimikrobiyel direncin yaygınlaşması, mikroorganizmaların ortamdan elimine edilmesini zorlaştırmıştır. Bu durum, mikroorganizmalar ile başa çıkmak için alternatif yöntem arayışını teşvik etmiştir. Bu bağlamda, yeni geliştirilen ilaç stratejileri doğrultusunda, QS molekülleri ve mekanizması üzerinde de durulmaktadır. Mikroorganizmanın QS

mekanizmasının engellenmesi ile beraber, hücrelerin iletişim yolları engellenerek yeni ve başarılı bir tedavi sürecinin mümkün olacağı düşünülmektedir (109,147,151).

Biyofilm gelişiminin aşamaları Şekil 2.1.' de verilmiştir (152,153).



**Şekil 2.1.** Biyofilm gelişiminin aşamaları

Biyofilmler, çok çeşitli alanlarda oluşmakta ve önemli sorunlara yol açmaktadır. Bu sorunların ortadan kaldırılabilmesi için ya biyofilmlerin henüz oluşmadan engellenmesine ya da oluşan biyofilmin ortamdaki kaldırılmasına yönelik uygun stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, biyofilmlerin yapı ve oluşum mekanizmalarını iyi anlayabilmek oldukça önemlidir (154,155).

### **2.9.2. BİYOFİMLERİN GIDA SANAYİ AÇISINDAN ÖNEMİ**

Gıda kaynaklı hastalıklar gıda üretim, dağıtım ve tüketim zincirinde oluşan kontaminasyonların gıda kompozisyonları içerisine dâhil olması ve sonrasında bu gıdaların tüketilmesiyle meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporunda gıda kaynaklı enfeksiyonların önemli başka bir nedeninin de gıda üretim sürecinde oluşan biyofilmler olduğu bildirilmiştir (72,156).

Gıda işleme ortamlarında oluşan biyofilmler sadece yüzeylerde sınırlı kalmayıp gıdanın kendisinde de oluşarak çapraz kontaminasyon riskini arttırmaktadır. Bu durum gıda kontaminasyonuna, gıda işleme etkinliğinin azalmasına, gıda enfeksiyonu riskinin artmasına ve gıda ekipmanlarında ısı transferinin azalmasına neden olmaktadır. Biyofilm temizliğinin etkisiz olduğu yerlerde ise devam eden bir kontaminasyon rezervuarı oluşmakta ve bu rezervuar yeni mikroorganizma için tutunma yeri sağlamaktadır (157–162).

Gıda işleme ortamları, fizikokimyasal koşullarından dolayı; mikroorganizmaların nem değişikliği, besin kıtlığı, uygun olmayan sıcaklık ve pH koşulları gibi çevresel streslere maruz kalmasına neden olmaktadır. Bu maruziyetle beraber uygulanan yetersiz temizlik ve sanitasyon süreçleri de mikroorganizmaları ortamdaki elemine edememekte ve strese sokmaktadır (163–165). Bu stres ortamı ise biyofilm oluşumunu teşvik etmektedir. Gıda işleme hatları ve ekipmanlarının yüzeyindeki organik maddeler bakterilerin tutunması için elverişli bir ortam sağlamaktadır. Bu bakteriler çeşitli temizlik ve dezenfeksiyon işleminden sonra ortamdaki elemine edilebilseler bile, mikroorganizmanın inatçı (persister) formu bu temizlik ve dezenfeksiyon süreçlerine karşı hayatta kalmayı başarmakta ve yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmaktadır. Uygulanan temizlik ve dezenfeksiyon prosedürleriyle giderilemeyen kalıntılar ise tekrarlanan bakteriyel gıda kontaminasyonlarının en önemli kaynağını oluşturmaktadır (154,166,167).

Mikroorganizmalar yüzeye tutunduktan sonra EPS üretimi başlamaktadır. EPS, mikroorganizmanın gıda ekipmanı, taşıma, dağıtım ve depolama yüzeyleri gibi ortamlara ve/veya sebze, et, kemik, meyve gibi biyolojik yapılara daha sağlam tutunabilmesi için uygun ortamı sağlamaktadır. Bununla beraber, mikroorganizmanın koloni oluşturmaya ve ortama tutunmasına yardımcı olarak biyofilm oluşumunu da desteklemektedir. EPS ayrıca, besin maddelerinin alımı, oksijen difüzyonu ve atık maddelerin dışarı atılması gibi pek çok işleve sahiptir. Bununla beraber biyofilm hücreleri üzerinde oluşturduğu katman sayesinde, onları antimikrobiyel ve dezenfektan maruziyeti gibi olumsuz durumlara karşı da korumaktadır (159,163,168,169).

Gıda kaynaklı bakteriyel biyofilmler hakkında yayınlanan ilk raporlar *Salmonella* spp. biyofilmlerini bildirmektedir. İlerleyen zamanlarda *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus* spp. ve *Escherichia coli* O157:H7 türlerinin oluşturduğu biyofilmler de literatürdeki yerini almıştır (170,171).

Biyofilmlerin ortamdaki elemine edilebilmesi için uygun, yeterli ve etkili temizlik ile birlikte dezenfeksiyon önlemlerinin alınabilmesi gereklidir. Bu bağlamda öncelikle biyofilm varlığının tespit edilebilmesi, sonrasında da oluşan biyofilmin özelliğine göre (biyofilmin oluştuğu yüzey türü, biyofilmin homojen/heterojen olması ve içerdiği mikroorganizmanın türü, biyofilmin fazı) çözümlerin geliştirilebilmesi oldukça önemlidir.

Biyofilm yapı ve mekanizmasının iyi anlaşılabilmesi, biyofilmlerle mücadelede akılcı stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (172–175).

### 2.9.3. BİYOFİLM VARLIĞINI TESPİT ETME YÖNTEMLERİ

Biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, biyofilm enfeksiyonlarını ve biyofilm kaynaklı kontaminasyonları engellemek açısından oldukça önemlidir. Biyofilm varlığı *in vitro* ve *in vivo* olarak, doğrudan ya da dolaylı şekilde belirlenebilmektedir. Bu tespit yöntemleri, araştırmak istenen özelliğe ve çalışmanın amacına uygun olarak seçilmektedir. Bu bağlamda kullanılan *in vitro* yöntemler arasında besiyerinde koloni oluşumu tayini, kolorimetrik yöntemler ve mikroskopi gibi konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra, moleküler yöntemler ve yüksek verimli -omik teknolojileri gibi yeni nesil teknikler de sayılabilir. Biyofilm oluşumu tayinininde *in vivo* yöntemler de kullanılabilmektedir (176).

#### 2.9.3.1. In-Vitro Yöntemler

Biyofilm oluşumunun tespit edilmesi için kullanılan yöntemlerden bir tanesi besiyerinde koloni oluşumunun gözlenmesidir. Bu amaçla en çok tercih edilen besiyeri Kongo Kırmızısı agardır (177). Biyofilm oluşumuna, oluşan koloni rengine göre karar verilmektedir. Agarlı ortam üzerinde oluşan siyah ve bordo renkli koloniler biyofilm oluşumunun; beyaz, pembe ve kırmızı renkli koloniler ise mikroorganizmanın biyofilm oluşturmadığının göstergesidir (177–179). Biyofilm oluşumunu tespit etmek için kullanılan bir diğer yöntem ise, mikroskopi yöntemidir. Bu amaçla taramalı elektron mikroskopları (SEM), geçirimli elektron mikroskopları (TEM) ve CLSM gibi mikroskoplardan yararlanılmaktadır. SEM, biyofilm yapılarının yüksek çözünürlüklü olarak incelenmesi için kullanılan ilk mikroskobik yöntemdir. Bu yöntem biyofilm yapısının ayrıntılı olarak incelenmesini sağlamaktadır. Ancak mikroskopi öncesi ön hazırlık aşamalarında (sabitleme, boyama, kurutma), yapıda bozulmalar meydana geldiği için dolayısıyla örnekte de bozulmalar ortaya çıkabilmektedir (180–182). TEM ise, biyofilm yapısını incelemek için tercih edilebilen bir diğer mikroskobik yöntemdir. Bu yöntem de SEM'e benzer ön hazırlık aşamalarını içermektedir. Bununla beraber biyofilm EPS'si reçineye gömüldüğü ve çok ince kesitler alındığı için, biyofilmin 3 boyutlu yapısı incelenememektedir (181,182). CLSM, biyofilm yapısını incelemek için kullanılan bir diğer mikroskopi yöntemidir. Bu mikroskopi yönteminde incelenecek olan örnekler ön işlem aşaması gerektirmeden direk

incelenebilmektedir. Böylece örneklerin canlı olarak incelenmesi mümkün olmaktadır. CLSM yöntemin bir diğer avantajı ise, biyofilm yapısının 3 boyutlu olarak gözlenmesini mümkün kılmaktadır. Aynı zamanda polisakkaritler, lipidler ve nükleik asitlerin biyofilm içerisindeki yoğunluk ve konumu hakkında da bilgi vermektedir (121,176,183,184).

Biyofilm varlığını tayin etmek için kolorimetrik yöntemlere de sıklıkla başvurulmaktadır. Bu yöntemler genellikle biyofilm oluşumu, planktonik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması, tutunan hücrelerin boyanması ve ölçülmesi aşamalarından oluşmaktadır. Metil tetrazolyum tuzu (MTT) bu amaçla kullanılan kolorimetrik bir boyadır. MTT (3-(4,5 dimetildizaol, 2 il)-2,5- feniltetrazolyum bromit), metabolik aktivite ile beraber mor renkli formozan kristallerine indirgenen sarı renkli bir tuzdur. Günümüzde bu yöntem biyofilm çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (185). Tetrazolyum tuzu (XTT) biyofilm tayini amacıyla kullanılan bir diğer kolorimetrik yöntemdir. XTT (2,3 bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianalid), canlı hücreyle aktive olduğunda formozana indirgenerek renk değişimi ile sonuçlanmaktadır. Biyofilm içerisindeki canlı hücre aktivitesi ölçüldüğü için, biyofilm tayini yanında antimikrobiyel duyarlılık ya da dezenfeksiyon başarısını tespit etmek amacıyla da kullanılabilir. Canlı hücre aktivitesi ile reaksiyon oluştuğu zaman, açık sarı renkli çözelti aktivite derecesine göre turuncuya dönüşmektedir. Ancak XTT'nin formozana indirgenmesi için önerilen yoğunlukta menadion çözeltisiyle beraber kullanılması gerekmektedir (179,186,187). XTT çoğunlukla fungal biyofilm çalışmalarında kullanılsa da bakteriyel biyofilmlerin canlılık aktivitesini ölçmek için XTT'nin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle antimikrobiyel duyarlılık ve dezenfektan başarısı testlerinde canlı hücre aktivitesinin saptanması kritik olduğu için, bu tür deneylerde sıklıkla tercih edilmektedir (188–192). MTT ve XTT sadece antimikrobiyel ve dezenfektan aktivitesi için değil, aynı zamanda stres koşullarında mikroorganizmanın canlılık aktivitesini ölçmek için de kullanılabilir (193). XTT ve MTT kadar sık kullanılmaları da TTC (2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium klorür) ve INT (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolium) boyaları da biyofilm canlılık tayinininde kullanılan tetrazolyum tuzlarıdır. Bu tetrazolyum tuzlarının uygulama konsantrasyonları, inkübasyon süreleri ve spektrofotometrede okutma dalga boyları birbirinden farklılıklar göstermektedir (194). Biyofilm tayini için kristal viyole gibi boyalar da kullanılabilir. Bu boyalar, tespit edilmiş (sabitlenmiş) hücre dışı matris polimerlerini boyar ve bu nedenle canlı ve ölü hücreler birbirinden ayırt



edilemez (190). Bu yüzden antimikrobiyel duyarlılık araştırmalarında kullanımları sınırlıdır (194).

Biyofilm tayini için, mikroorganizma türüne özgü biyofilmden sorumlu genlerin araştırıldığı moleküler yöntemlere de başvurulmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bu amaçla en sık başvuru olan yöntemdir (195). Biyofilm oluşumuna neden olan genlerin varlığının moleküler olarak saptanması için konvansiyonel PZR, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR), gerçek zamanlı/kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) gibi yöntemler tercih edilmektedir (81,196–198).

Hücrelerin biyofilm gelişimi esnasındaki gen ekspresyon patternleri ve sentezledikleri proteinlerin çeşit ve miktarları planktonik hücrelerden farklılıklar göstermektedir. Dahası, biyofilm gelişiminin farklı safhalarındaki gen ekspresyon patternleri ve protein seviyeleri de birbirinden farklı olmaktadır (199,200). Biyofilm oluşumu sırasında, mikrobiyel hücrelerde gen ve protein ekspresyonları ve/veya seviyeleri faza göre değışkenlik göstermektedir (200). Biyofilm oluşum aşamalarında eksprese edilen gen ve proteinleri belirleyebilmek, amaca yönelik olarak biyofilm üreticisi suşun eradike elimine edilmesine imkân sağlayacaktır. Transkriptomik ve proteomik analizler ile biyofilm ve planktonik hücre gelişiminde mikroorganizmaların transkripsiyonel ve translasyonel ekspresyonları arasındaki farklar belirlenebilmektedir. Böylece planktonik hücre ve biyofilm hücreleri arasındaki direnç farklılıklarının da nedeni anlaşılabilmektedir. Aynı zamanda bu yaklaşımlar ile adezyon, hücreler arası iletişim ve biyofilm oluşturabilme kapasitesi ile ilgili elde edilen tüm veriler, geniş bir veri tabanında toplanabilmektedir (201,202).

#### **2.9.3.2. *In-Vivo* Yöntemler**

Yukarıda özetlenen yöntemler sayesinde biyofilm oluşum basamakları ve biyofilmlerin antimikrobiyel/dezenfektan uygulamalarına duyarlılığı gibi hususlar ile ilgili önemli bilgiler elde etmek mümkündür. Kan akımı, besin ve substrat miktarı, konak immün sisteminin tepkisi gibi parametreler de biyofilme ait süreçlerinin önemli belirleyicilerindendir (203,204).

#### **2.9.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES*' TE BİYOFİLM OLUŞUMU**

Gıda işleme ortamlarında biyofilmlerin oluşumu, işlenmiş ürünün kontaminasyonu açısından risk oluşturmaktadır. Bu ortamlardaki biyofilmler gıdanın bozulmasına yol

açabildiği gibi bazı durumlarda bozulmaya yol açmaksızın sadece patojenin taşınmasına da neden olabilirler. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar dezenfektanlardan korunarak hayatta kalma başarılarını arttırmaktadırlar. Bu durum, gıdanın raf ömrünün azalması ve hastalık geçiş riskinin artması gibi sonuçlara neden olmaktadır. Ayrıca, biyofilm yapısında bulunan ve dezenfektanlar ile giderilemeyen ekstraselüler polimerik madde, biyofilm yapısına yeni katılacak olan mikroorganizmaların bağlanmasını kolaylaştırmakta ve bu da hastalık riskini daha da arttırmaktadır (136,175,205–207).

Çeşitli çalışmalarda, *L. monocytogenes* biyofilm oluşumunun bakteri büyüme fazı, sıcaklık, ortam, substratların fiziksel ve kimyasal özellikleri, nem miktarı ve diğer mikroorganizmaların varlığı gibi farklı faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (205,208,209). Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan polipropilen, çelik, kauçuk veya cam yüzeyler *L. monocytogenes*'in kolaylıkla tutunup gelişebildikleri yüzeylerdir (175,208). Biyofilm oluşumu ısı transferinde bozulmaya ve metal yüzeylerde korozyona neden olabilir. Bu nedenle biyofilmlerin elimine edilmesi için gerekli önlemlerin alınması oldukça önemlidir. Biyofilm oluşumunu kontrol etmek için kullanılan yöntemlerden bazıları mekanik ve elle temizleme, kimyasal temizleme ve sanitasyon, enzim ve faj uygulamasıdır (207).

Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes* suşlarının farklı serovaryetelerinin virülens özellikleri ve biyofilm oluşturma yetenekleri arasında farklılıklar olabileceği anlaşılmıştır. Çoğu listeriyozis salgınının 4b serovaryetesinden kaynaklanmasına rağmen, 1/2b serovaryetesi gıdalardan ve çevreden sıklıkla izole edilmektedir. Djordevic ve ark. (2002) ile Borucki ve ark. (2003), Soy I hattı içerisinde yer alan suşların (serovar 1/2b ve 4b), Soy II (serovar 1/2a ve 1/2c) içerisinde yer alan *L. monocytogenes* suşlarına göre daha fazla biyofilm ürettiklerini belirtmişlerdir (176,210). Lunden ve ark. (2000) ise 1/2c serovaryetesinin 1/2a ve 4b'ye göre; 4b'nin de 1/2a'ya göre daha iyi biyofilm oluşturduğunu belirtmişlerdir (211).

Borucki ve ark. (2003), *L. monocytogenes*'in persister olan ve olmayan suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, persister hücrelerin daha iyi biyofilm oluşturduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar bu deneyin tek bir izolatın aynı ortamdan tekrar tekrar izole edildiği durumlar için akla yatkın ve açıklayıcı bir model olabileceğini düşünmüşlerdir (176).

Oliveria ve ark. (2010), *L. monocytogenes* ATCC19117 suşunun 3, 48, 96, 144, 192 ve 240 h sonunda paslanmaz çelik yüzeylerde (AISI 304 (#4)) paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm oluşumunu SEM ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, *L. monocytogenes* ATCC19117 suşunun paslanmaz çeliğe hızlı ve kolayca tutunabildiğini ve 240 h sonunda olgun biyofilm yapısı oluşturabildiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmada, yüzeye hızlı yapışma kapasitesinin *L. monocytogenes*'i gıda endüstrisi için potansiyel bir risk haline getirdiğinin de altı çizilmiştir (212).

Kyere ve ark. (2020), çalışmalarında marul yapraklarından izole ettikleri 3 adet *L. monocytogenes* suşunun paslanmaz çelik kuponlarda 4°C ve 10°C'de biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemişlerdir. 10°C'lik inkübasyon sıcaklığından sonra biyofilm miktarı 6,4–7,2 log KOB/cm<sup>2</sup> olarak belirlenirken, 4°C'lik inkübasyon sıcaklığından sonra biyofilm miktarı 4,3–4,8 log KOB/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur (213).

#### **2.9.5. LISTERIA MONOCYTOGENES'TE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN MOLEKÜLER DOĞASI**

Biyofilm gelişiminde ilk aşama olan mikrobiyel hücrenin yüzey tutunması için, flagellar hareketlilik büyük avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, *Listeria* spp. biyofilmlerinde genetik düzenlemeler ile ilişkili bazı çalışmalar, flagellar hareketi sağlayan genlere odaklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *flaA*, *fliI*, *fliQ*, *motA* ve *lrmg\_00396* genlerinin flagellar hareketten sorumlu olduğu ve bu genlerden biri ya da birkaçında gerçekleşen mutasyonun biyofilm oluşumunu olumsuz etkilediği belirtilmektedir (214). Todhanakasem ve ark. (2008), flagelluma bağlı motilite ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak adına *cheA*, *fliF*, *fliI* ve *motA* mutantlarının biyofilm oluşumunu nasıl etkilediğini araştırmışlar ve bu genlerdeki mutasyonların biyofilm oluşumunu olumsuz etkilediğini bulmuşlardır (215).

Internalinler, *L. monocytogenes*'in konak hücre yüzeyine ve epitelyal hücrelere tutunmasını sağlayan yüzey proteinleridir. *InlA* geni, internalini (InlA) kodlamanın yanı sıra, yüzey bağlanmasında da rol oynamaktadır. Bakterilerin yüzeylere tutunması ayrıca ortamın fizikokimyasal özelliklerinden de etkilenmektedir. Bonsagina ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada; 32 adet *L. monocytogenes* suşunu internalin gen bölgesi varlığı açısından test etmişlerdir. Çalışmada ayrıca, suşların üç farklı yüzeyde (polisistren, cam ve paslanmaz çelik) ve farklı sıcaklıklarda (4°C, 20°C ve 30°C) biyofilm oluşturabilme

yeteneği de araştırılmıştır. Araştırma sonunda, tüm suşların *inlA* genine sahip olduğu ve 32 suştan 25 tanesinin (%78,1) ayrıca *luxS* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, bakterilerin hidrofilik yzeylere (paslanmaz elik ve cam) tutunma oranının hidrofobik yzeylere (polistiren) göre daha iyi olduğu saptanmıştır. 20°C'de 24 h'lik inkubasyon sonunda paslanmaz elik ve cam yzeylerde sırasıyla, 30 adet (%93,8) ve 26 adet (%81,3) suşun biyofilm oluşturduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, yzey bileşiminin biyofilm oluşumu için önemli bir faktör olabileceği vurgulanmıştır (216) .

Brauge ve ark. (2018) tarafından *L. monocytogenes* 1/2a ve 4b serotiplerinin oluşturduğu biyofilm yapısı içinde, hücre duvarı bileşeni olan taykoik asidin ana bileşen olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Hücre duvarı bileşeni olan N-asetilglikozamin (N-acetylglucosamine: GlcNAc) sentezinden sorumlu bulunan *lmo2549* ve *lmo2550* genlerinin biyofilm oluşumundaki fonksiyonları araştırıcılar tarafından saptanmaya çalışılmıştır. Denemede *lmo2550* gen bölgesinde oluşan mutasyonun, tutunma sırasında yabanil tip *L. monocytogenes* suşuna kıyasla mutant suşun paslanmaz çeliğe tutunma oranının düşmesine neden olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, biyofilmin üç boyutlu yapısı incelendiği zaman, yabanil tip suşlarda oluşan biyofilmler ile *lmo2549* veya *lmo2550* gen bölgeleri inaktive edilen iki mutant suş arasında, mikrokoloni yapısı açısından da fark bulunmuştur (217).

Kumar ve ark.(2011) tarafından yapılan bir çalışmada; *agrA*, *flaA*, *degU* ve *ami* gen bölgeleri açısından yabanil olan *L. monocytogenes* suşları ve laboratuvar da türetilmiş mutantlarının abiyotik yzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturma yetenekleri araştırılmıştır. *degU* geninin etkisizleştirilmesinin biyofilm oluşumunu tamamen ortadan kaldırdığını, bununla birlikte flagellar gen *flaA*, agregasyondan sorumlu *agrA*'nın ve otolizin-adezin geni *ami*'nin inaktivasyonunun, ilk bağlanma ve daha sonra olgun bir biyofilmin gelişiminde ciddi bozulmaya yol açtığını gösterilmiştir (55).

Piercey ve ark. (2017) ise, *hlyA* ve *prfA*'nın inaktivasyonun *L. monocytogenes* agregasyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, her iki mutantın 25°C ve 37°C'deki kavun kabuğuna yabanil tip suşlara benzer şekilde tutunduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, mutantların kavun üzerinde gelişebilmesi ve rekabetçi uyumunun her iki sıcaklıkta da etkilenmediğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar tarafından *hlyA* ve *prfA*'nın biyofilm oluşumu ve agregasyonunda önemli rolü olduğu, ancak *L.*

*monocytogenes*'in taze ürünlere kolonize olması için bu iki önemli virülens genin gerekli olmayabileceği ifade edilmiştir (218).

Gandra ve ark. (2019) paslanmaz çelik ve polistiren yüzeylerde farklı süre ve sıcaklıklarda (10°C, 20°C ve 37°C; 8 h, 12 h, 24 h ve 48 h) biyofilm oluşturma özelliğine sahip 2 adet suş ve biyofilm oluşturmayan 2 adet suş olmak üzere toplam 4 adet *L. monocytogenes* suşunda gelişim özellikleri ile *agr* lokusu ve *prfA* geninin gen ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. *agr* lokus ekspresyon seviyelerinin biyofilm oluşturan suşlarda daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca biyofilm oluşturma yeteneğinden bağımsız olarak izolatlar arasında *prfA* geninin ekspresyonunda ise bir fark görülmediği bildirilmiştir. *agr* lokusu ve *prfA* geninin maksimum ekspresyonun ise 37°C'de gözlemlendiği, 10°C'de ekspresyonun en düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar *agr* lokusu ve özellikle *agrB*, *agrC* ve *agrD* genlerinin, *L. monocytogenes* suşlarında biyofilm üretiminin ilk tutunma safhasında önemli olduğu ve *agr* lokusu ile *prfA* gen ekspresyon seviyelerinin sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiği gösterilmiştir (219).

Alonso ve ark. (2014), D-alanilasyon yolu genleri ile *phoPR* genlerinin biyofilm oluşumu açısından önemini araştırmışlardır. *phoPR* ve *dltABCD* genleri delesyona uğratılmış ve mikrotitre plak ve lazer mikroskopunda biyofilm oluşumu incelenmiştir. Araştırmacılar tarafından mutant suşlardaki biyofilm oluşumunda, yabani tiplerdeki biyofilm oluşumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu belirtmiştir (214).

Stijn van der Veen ve ark. (2010), sınıf I ısı-şok tepkisinin transkripsiyonel düzenleyişini kodlayan *hrcA*'nın ve sınıf I ısı-şok tepkisi şaperon proteinini kodlayan *dnaK*'nın statik ve sürekli akış biyofilm oluşumuna ve benzalkonyum klorür ile perasetik asit direncine karşı rolünü araştırmışlardır. Sürekli akış biyofilm oluşumu sırasında *hrcA* ve *dnaK*'nın indüksiyonu, kantitatif gerçek zamanlı PZR ve promotor raportörler kullanılarak gözlenmiştir. *hrcA* ve *dnaK*'nın mutantları da incelenmiş ve bu genlerin biyofilm oluşumunda önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Aynı zamanda *hrcA* ve *dnaK*'nın benzalkonyum klorür ve perasetik asit direnci açısından da önemli genler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma *L. monocytogenes* biyofilm oluşumu ve dezenfektan direnci için *hrcA* ve *dnaK* genlerinin önemli olduğunu ortaya koymuştur (220).

**Çizelge 2.7.** *L. monocytogenes*'te biyofilmden sorumlu genler

| <b>Biyofilm Geni</b>                      | <b>Görev</b>                                             | <b>Kaynaklar</b> |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------|
| <i>fliQ, fliA, fli1, motA, cheA, fliF</i> | Hareket ve konak hücreye tutunma                         | (214,215)        |
| <i>hrcA</i>                               | Dezenfektan direnci, statik biyofilm yapısının korunması | (220)            |
| <i>luxS</i>                               | Quorum sensing                                           | (216)            |
| <i>phoR</i>                               | Fosfat algılama                                          | (214)            |
| Imo 2026 ( <i>inlL</i> ),<br>Imo2549-2550 | Adezyon ve konak hücre istilası                          | (221)            |
| <i>hlyA</i>                               | Por oluşumu, fagazom kaçıışı                             | (222)            |
| <i>prfA</i>                               | Gen regülasyonu                                          | (99,219,222)     |
| <i>inlA</i>                               | Adezyon ve konak hücre istilası                          | (216)            |
| <i>agrB, agrC, agrD</i>                   | Mikroorganizmaların kümelenmesi                          | (219)            |

#### **2.9.6. LISTERIA MONOCYTOGENES SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNU ÖNLEME STRATEJİLERİ**

Gıda kalitesi ve güvenliği standartlarının uygulanabilmesi için belgelenmiş ve onaylanmış bazı kriterler mevcuttur. Bu kriterler, belirli düzenleyici kurumlar tarafından denetleme yolu ile hayata geçirilmektedir. Bu bağlamda, gıda işleme tesislerinde ‘Good Manufacturing Practice’ (İyi Üretim Uygulaması -GMP) ve ‘Hazard Analysis Critical Control Point’ (Tehlike Analizi Kritik Kontrol Noktası-HACCP) protokolleri gibi önlemler takip edilmektedir (12,223).

*L. monocytogenes* gıda işleme ortamlarında kolonize olabileceğinden, gıdalarda çapraz kontaminasyon riski taşımaktadır. Bu ortamlara kolonizasyon yeteneği kazandıran yapılardan en önemlisi ise biyofilm oluşumudur. Uygun şekilde temizlenmemiş yüzeyler katı (tortu) birikimi teşvik etmekte ve su varlığında bakteri biyofilmlerinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır (207,224).

Biyofilm oluşumunu engellemek için mekanik veya elle temizleme, kimyasal temizleme, enzim uygulamaları, ultrasonikasyon uygulaması, faj kullanımı ve bakteriyosin uygulaması

gibi yöntemler kullanılabilir (225). Biyofilm oluşumunun engellenmesi ilk aşamada en önemli basamaktır. Bu bağlamda, mikroorganizmanın tutunabileceği ortam ve yüzeylerin düzenli olarak temizlenmesi önem taşımaktadır (162,168).

Gıda işleme hatları ve ekipmanlarında oluşan biyofilmi ise kontrol etmek amacıyla uygulanan ilk yöntem mekanik temizliktir. Mekanik fırçalar yardımıyla, yüzeylere uygulanan yüksek kuvvet ve basınç ile yüzey temizliği etkin bir şekilde gerçekleştirilmektedir (167). Tek başına temizleme prosedürlerinin uygulanmasının biyofilmi tam olarak eradike edememesi ve bakterilerin yaklaşık %90'ının yüzeylerden ayrılarak farklı bir alanda yeni biyofilm yapısı oluşturmaya ise önemli bir sorundur (226). Bu nedenle geri dönüşümsüz olarak bağlanmış hücrelerin eradikasyonu ve biyofilmin ortadan kaldırılabilmesi için, güçlü mekanik kuvvet ile beraber çeşitli enzimler, deterjanlar ve yüzey aktif maddeler kullanılmalıdır. Alkaliler, asitler, sürfaktanlar, enzimler ve metal iyonları gibi kimyasal dezenfektanlar, olgunlaşmamış biyofilmlerin bağlanmasına ve gelişmesine müdahale ederek biyofilmi ortadan kaldırmaktadır (207,227).

Gıda endüstrilerinde, yüzeylerin veya ekipmanın dezenfeksiyonunda çoğunlukla dezenfektanlar kullanılmaktadır. İyi bir dezenfektan; etkili, güvenli, kullanımı kolay, yüzeylerden hızla temizlenebilir olmalı ve ayrıca nihai ürünlerin sağlık özelliklerini ile duysal değerlerini etkileyebilecek toksik kalıntılar bırakmamalıdır. Oksitleyici maddeler, yüzey aktif bileşikler ve iyodoforlar olarak geniş bir şekilde sınıflandırılabilen farklı dezenfektan türleri mevcuttur. Halojen bazlı bileşikler, perasetik asit (PAA), ozon ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar, oksitleyici ajanlar grubunda yer almaktadır. Asit anyonik bileşikler ve kuaterner amonyum bileşikleri (QAC) ise yüzey aktif bileşiklerdir (99,226,228,229). Dezenfektanların etkisi; yüzey özelliklerine, uygulama sıcaklığı ve temas süresine, ürün konsantrasyonuna, yüzeydeki kalıntı miktarına, pH'ya, ortamdaki suyun fizikokimyasal özelliklerine göre değişebilmektedir. Mikroorganizmanın türü ve konsantrasyonu da dezenfektanın verimini etkileyen bir diğer önemli başlıktır (14,230).

PAA, hidrojen peroksit ile asetik asitin reaksiyonu veya asetaldehitin oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Yüksek oksitleme kapasitesi nedeniyle ideal bir dezenfektan olarak bilinmektedir. Etki mekanizmasının proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonu, zarların bozulması veya DNA'daki bazların zarar görmesi aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Bu

bileşik gıdalarda güvenli ve çevre dostu kalıntılara ayrıştığı için durulama yapılmadan kullanılabilir. Bileşik keskin bir koku ve düşük bir pH'ya (pH=2,8) sahiptir. PAA genellikle %5 ile %15 arasındaki konsantrasyonlarda hazırlanmaktadır. PAA, gıda ile temas eden yüzeylerdeki tortu, koku ve biyofilmleri kontrol etmek için hem gıda ile temas eden yüzeylere hem de gıda ile doğrudan temas için etkili bir mikrobiyel kontrol ajanı olarak kullanılır. PAA hızla bozunmakta, çok az kalıntı bırakmakta ve nispeten zararsız olarak bileşenlerine ayrışmaktadır (161,162,231).

Ozon, kendiliğinden oksijene dönüştüğünden dolayı hem gıda ile temas eden yüzeylerde hem de nihai ürünlerde zararlı kalıntılar bırakmamaktadır. Bu da ozonun gelecek vaat eden, çevre dostu bir teknoloji olarak kabul görmesine neden olmaktadır. Ozon, hücre bileşenlerinin oksidasyonu ve mikroorganizmaları inaktive eden oksitleme kapasitesi sayesinde, etkili bir dezenfektandır. Etki mekanizmasının mikroorganizmaların hücre zarı bütünlüğünü bozmak olduğu belirtilmektedir. Ozon yüksek kararsızlığı ve reaktivitesi nedeniyle, salınan serbest oksijen atomu ile oksidasyona neden olan toksik yan ürünler oluşturmadan hızla moleküler oksijene parçalanmaktadır. Bu durum ozonun antimikrobiyel özelliği olarak ifade edilebilir. Ozon, gıda işleme ortamlarında kullanılan diğer kimyasallara kıyasla daha az olumsuz çevresel etkiye sahip olup, farklı mikroorganizmalara karşı da etkinliği kanıtlanmıştır (232–234).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyofilm matrisini etkileyen, serbest radikallerin oluşumuna neden olan ve yüksek oksitleme kapasitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir diğer dezenfektandır. Güvenlik açısından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin alerjik reaksiyonlara neden olmayan güvenli bir çözüm olduğu bilinmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ürün kalitesini olumsuz etkilemeden yüksek konsantrasyonda gıda patojenlerine karşı kullanılabileceği saptanmıştır (162).

QAC ise katyonik yüzey aktif ajanları grubunda yer alan dezenfektanlardır. Bu bileşikler yüksek yüzey aktiviteleri nedeniyle iyi temizleme kapasitesine sahiptirler. Birçok çalışmada *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp.'ye karşı etkinlikleri gösterilmiştir. Ancak etkinlikleri zaman, sıcaklık, konsantrasyon ve organik madde varlığı gibi çeşitli faktörlere göre değişebilmektedir. QAC mikrobiyel hücre membranlarını etkileyerek, membran bütünlüğünü bozmakta ve dolayısıyla da hücre içi içerik hücre dışına sızmaktadır. Nihayetinde ise hücrenin ölümü gerçekleşmektedir (235–237).



Sodyum hipoklorit (NaClO), temizleme veya dezenfeksiyon için kullanılan bir diğer kimyasal bileşiktir. Biyofilm inaktivasyonu için etkili bir dezenfektan olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, düşük pH'da alkali pH ortamlarına kıyasla daha etkili olduğu bilinmektedir (162,231,238).

NaClO ve PAA'nın birlikte *L. monocytogenes* biyofilm hücrelerine uygulanması sonucu, biyofilmin protein yapıları ve DNA yapısı üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Böylece EPS yapısı zayıflayarak, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmaları engellenmektedir (227).

Chavant ve ark. (2004), farklı gelişme evrelerindeki *L. monocytogenes*'in planktonik ve biyofilm formundaki hücreleri üzerinde farklı dezenfektanların etkinliğini araştırmışlardır. Denemede asetik asit (pH 5,0), NaOH (pH 12,0), %10 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %10 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-asetik asit (pH 5,0) karşımı, QAC (20 ppm) ve gliseril monolaurat (75 ppm) gibi dezenfektanların etkinlikleri üzerinde yoğunlaşmışlardır. Çalışma sonucunda alkalilerin hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde oldukça etkin olduğu saptanmıştır. QAC'nin ise, hücrelerin %98'inden fazlasını inaktive ettiği, ancak 7 günlük biyofilm yapısında etkisiz olduğu belirlenmiştir. Diğer dezenfektanların ise hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde patojeni tamamen inhibe edemedikleri vurgulanmıştır (239).

Poimenidou ve ark. (2016), 12 adet *L. monocytogenes* suşunun biyofilm oluşturma yeteneğini ve dezenfektanlara karşı toleransını araştırmışlardır. Yüzey tipinin etkisi ile ilgili olarak, biyofilm oluşumu ve yüzey tipi arasında anlamlı bir fark bulunamamış, bununla beraber polistiren üzerinde oluşan biyofilmlerin, paslanmaz çelikte oluşan biyofilmlere kıyasla dezenfektanlara karşı daha toleranslı olduğu belirtilmiştir. Tüm suşlar içinde en güçlü biyofilm üretici olan suşun ise, QAC'ye karşı önemli ölçüde duyarlı olduğu bulunmuştur (240).

Skowron ve ark. (2018) işlenmiş balık ürünlerinden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarını karakterize etmek ve farklı yüzeylerde farklı dezenfektanların etkisini gözlemlemek için bir çalışma yapmışlardır. Biyofilmlerin alüminyum folyoda kauçuk yüzeylere göre daha iyi oluştuğu tespit edilmiş ve bununla beraber biyofilmlere karşı en etkili ajanın PAA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olduğu vurgulanmıştır (241).

Pang ve ark. (2019), QAC'nin *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerine etkisini araştırmışlardır. QAC'nin 15°C'lik uygulama sıcaklığında *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde 3,6-3,9 log'luk bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca *L. monocytogenes* ile beraber farklı türleri de içeren heterojen biyofilmler üzerinde ise 3,2-4,0 log'luk bir azalma saptanmıştır (242).

Hua ve ark. (2019), paslanmaz çelik, düşük yoğunluklu polietilen (LDPE), polivinil klorür (PVC), polyester (PET) ve kauçuk gibi gıda ile temas eden yüzeylerde *L. monocytogenes* biyofilmlerine karşı, farklı konsantrasyonlarda yaygın olarak kullanılan dört kimyasal dezenfektanın etkinliğini değerlendirmişlerdir. QAC, klor ve klordioksit konsantrasyonlarının artırılması veya uygulama süresinin 1 dk'dan 5 dk'ya uzatılmasıyla, *L. monocytogenes* biyofilmine karşı etkinliğin daha da arttığı belirtilmiştir. Ayrıca 400 ppm QAC, 5 ppm klordioksit ve 200 ppm klorin çözeltisinin 5 dk süreyle uygulanması sonucunda, yüzeylere bağlı olarak sırasıyla 3,0-3,7 log KOB/mL, 2,4-2,7 log KOB/mL ve 2,6-3,8 log KOB/mL'lik biyofilm azalışına neden olduğu bulunmuştur. Bununla beraber 160 ve 200 ppm'deki PAA'nın, 1 veya 5 dk'luk süreyle teması, biyofilmlere karşı benzer antimikrobiyel etkiler göstermiş ve 200 ppm PAA'nın 5 dk'luk uygulanması ile test edilen yüzeylerde 4,0-4,5 log KOB/mL'lik biyofilm azalması sağladığı da belirtilmiştir (243).

Dezenfektanların birbirleriyle kombine olarak kullanımının, gıda ile temas eden yüzeylerdeki biyofilmlerin giderilmesinde daha etkili olduğu ifade edilmektedir (209,244). Dhowlaghar ve ark. (2018), paslanmaz çelik yüzeylerde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerine QAC bileşikleriyle  $H_2O_2$  veya PAA,  $H_2O_2$  ve oktanik asitten oluşan bir dezenfektan kombinasyonunun bu dezenfektanların tek başlarına kullanımından daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu durumun dezenfektanların biyofilm hücrelerine nüfuz etmelerini kolaylaştırabileceğinden veya oksitleyici etkisini artırarak biyofilmler üzerinde daha etkin olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dezenfektanların kombine kullanımı yanında dezenfektanlar ile farklı sanitasyon uygulamalarının birlikte kombine edilmesi de biyofilm eradikasyonu üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır (245). Sosa (2020), paslanmaz çelik ve polikarbonat kuponlarda *L. monocytogenes* biyofilmlerine karşı laktik asit (%4), PAA (200 ppm), QAC (400 ppm) ve UV-C'nin tek tek ve dezenfektan+UV-C kombinasyonunun etkinliğini birlikte değerlendirmiştir. Dezenfektanların uygulanması sonucu 6 log KOB/cm<sup>2</sup>'lik biyofilmlerde 2,6-3,6 log

KOB/cm<sup>2</sup>'lik ve UV-C'nin ise maksimum 1,8 KOB/cm<sup>2</sup>'lik azalma sağladığı, dezenfektanlar ile UV-C'nin kombine uygulamasının ise biyofilm eradikasyonunda önemli derece etkinliği arttırdığı saptanmıştır (209).

Biyofilm yapısının eradikasyonunda tercih edilen bir diğer yöntem de ultrasonikasyon uygulamasıdır. Ultrasonikasyon uygulaması ile biyofilm içerisinde bulunan hücreler hedef alınarak, planktonik faza geçmeleri amaçlanmaktadır. Ultrasonikasyon işlemi biyofilm yapısını ortadan kaldırmak için kimyasal olmayan, çevre dostu bir teknoloji olduğundan dolayı tercih edilmektedir (246).

Torlak ve Sert (2013), polisistren yüzeylerde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde düşük frekans seviyelerindeki ultrasonikasyonun etkinliğini araştırmışlardır. 1 dk, 5 dk ve 15 dk'lık uygulamadan sonra biyofilm biyokütlesindeki azalma yüzdesinin sırasıyla %20, %45 ve %87 olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Uzatılmış maruz kalma süresinin ise, *L. monocytogenes* biyofilm biyokütlesinin %90' ından fazlasını inaktive ettiğini belirtmişlerdir. Ultrasonikasyon uygulamasının, kimyasal dezenfeksiyonla kombine olarak uygulandığı durumlarda etkinlik daha da artmaktadır. Ultrasonikasyon işlemi ile uyarıldığında öncelikle olgun biyofilmlerin daha derin katmanlarındaki hücreler dezenfektanlara karşı daha duyarlı hale gelmekte ve sonuçta daha fazla inaktivasyon gözlemlenmektedir (247).

Hamann ve ark. (2018) tarafından gıda ekipmanları üzerinde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde, PAA ve ultrasonikasyonun ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının etkinliğini araştırmışlardır. PAA'nın *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerindeki etkinliğinin, 6 h'lik ve 24 h'lik biyofilmlerde sırasıyla %0,06 ve %0,24'lük biyokütle yoğunluğuna kadar azaltabilecek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 700 W'luk güçte 14 dk'lık süre ile uygulanan ultrasonikasyon işlemi sonucunda, biyofilm hücrelerinde 3,25 log KOB'luk bir azalma olduğu saptanmıştır. Ultrasonikasyon ve PAA'nın kombine uygulamasının ise; 24 h'lik biyofilm yoğunluğunu %0,24'ten %0,03'e kadar azaltabildiğini gözlemlemişlerdir (248).

Baumann ve ark. (2009), paslanmaz çelik kuponlarda oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerinin eradikasyonunu belirlemek için güçlü ultrason ve ozonlamanın etkinliğini ayrı ayrı ve kombine olarak test etmişlerdir. Bu amaçla, paslanmaz çelik kuponlara 0,25 ppm, 0,5 ppm ve 1,0 ppm'lik konsantrasyonlarda 30 ve 60 saniye boyunca ozon

uygulaması ile 20 kHz ve 120 W'luk güçte sonikasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulamaların her birinin tek başına biyofilm üzerinde önemli bir azalma sağladığı, güçlü sonikasyon uygulamasının ise tek uygulamalarda en etkin azalmayı sağladığı (60 saniyeden sonra 3,8 log KOB/mL azalma) vurgulanmıştır. Güçlü sonikasyon ve ozonun kombine uygulamasının ise en yüksek etkinlik sağladığı ve 0,5 ppm'lik bir ozon konsantrasyonunun (7,31 log KOB/mL azalma) biyofilmi tamamen eradike edebildiği belirtilmiştir (249).

Wiktorczyk ve ark. (2019), paslanmaz çelik kuponlarda oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerinde dezenfektan kullanımı öncesi yapılan ultrasonikasyon uygulaması sonucunda biyofilm miktarındaki azalmaları değerlendirmişlerdir. Bu amaçla 1 ve 5 dk (500 W/20 kHz) boyunca uygulanan ultrasonikasyon işleminden sonra, %0,5'lik konsantrasyonda QAC ile dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Dezenfeksiyonun sonikasyondan daha etkili olduğunu, sonikasyon ve dezenfeksiyon işleminin kombine uygulanmasının ise yöntemlerin ayrı ayrı kullanılmasına kıyasla daha etkili olduğunu gözlemişlerdir. 5 dk'lık sonikasyonla beraber 5 dk'lık QAC uygulamasının, biyofilm miktarında 6,42 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma sağladığı, 1 dk'lık sonikasyonla beraber 1 dk'lık QAC uygulamasının ise 2,03 log KOB/cm<sup>2</sup>'lik azalma sağladığını ifade etmişlerdir (250).

Biyofilmlerin ortamdan eleme edilmesi için başvurulacak bir diğer yöntem de dezenfektan muamelesi öncesi enzim bazlı deterjanlar kullanmaktır. Enzimler, hücre dışı matrisin lipid, karbonhidrat ve DNA bileşenlerini parçalayarak, hücreler arasındaki bağlantıları koparmakta, biyofilm bütünlüğünün bozulmasına ve bu hücrelerin biyofilm yapısından ayrılmasına neden olmaktadır (223,251). Enzimler, substrata özgüdür ve EPS matrisinin içeriği de türden türe değişmektedir. Bu nedenle, eklenen antibiyofilm enzimi de EPS matrisinin bileşimine spesifik olmalıdır (252). Bazen biyofilm yapısında birden fazla mikroorganizma türü bulunabileceği ve bu durumda da EPS heterojenliği artacağı için, enzim kokteyl karışımlarının uygulanması önerilmektedir (183). Enzimlerin aktivitelerini belirleyen diğer önemli etmenler ise; sıcaklık, pH, substrat, aktivatörlerin, kofaktörlerin veya inhibitörlerin varlığı ve/veya yokluğu gibi faktörlerdir (253).

*L. monocytogenes* biyofilm yapısında bulunan proteinlerin yapısını bozmak için yüzeylerde proteaz enzim uygulamaları denenmiştir. *L. monocytogenes*'in oluşturduğu biyofilme DNaz I ve proteinaz K'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iki enzimin de biyofilm

eradikasyonu açısından etkin olduğu saptanmıştır. Bununla beraber proteinaz K'nın DNaz I enzimine kıyasla daha etkili bir ajan olduğu ve potansiyel bir inhibitör olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (254).

Bakteriyofaj (faj) uygulaması biyofilm eradikasyonu için tercih edilen bir diğer önemli yöntemdir. Fajlar, biyofilm yapısına başarılı şekilde ulaşarak biyofilm matrisini bozmaktadır. Bu bağlamda fajlar, biyofilm oluşumunda rol oynayan çeşitli mikroorganizmaları kontrol etmek için doğal, oldukça spesifik, toksik olmayan, uygulanabilir bir yaklaşım sağlamaları nedeniyle gıda kaynaklı patojen biyofilmlerine karşı etkili bir araç olarak önerilmektedir (226,253,255).

Gutierrez ve ark. (2017), List-Shield ve Listex P100 bakteriyofaj preparatlarının kurutulmuş jambon ve paslanmaz çelik yüzeylerdeki işlenmiş et kalıntıları kaynaklı biyofilmler üzerindeki etkinliklerini değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucundan List-Shield'ın *L. monocytogenes* biyofilmlerinin %100'ünde, Listex P100'ün ise örneklerin %64'ünde etkili olduğu tespit edilmiştir (256). Listex P100'ün işlenmiş et ürünleri yanında, peynir ve tüketime hazır gıdalarda da başarılı bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir (2,257).

Asidik elektrolize su, biyofilm eradikasyonu amacıyla tercih edilen başka bir dezenfektandır. Asidik elektrolize suyun *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *L. monocytogenes* dâhil olmak üzere gıda kaynaklı patojenleri etkin bir şekilde inaktive ettiği bildirilmiştir. Asidik elektrolize su uygulaması sonucunda karbonhidrat bağları ile tirozin ve fenilalanin aminoasitlerinin yapısında bulunan aromatik halkalar deforme olmakta ve sonuç olarak hücre dışı polimerik madde bozulması gözlenmektedir. Ayrıca biyofilmlerdeki eDNA'yı ve hücre dışı proteinleri de etkili bir şekilde parçalamaktadır (53,197).

Gıda temas eden yüzeylerde ve gıdaların direk üzerinde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerini kontrol etmek için tercih edilen bir diğer alternatif yöntem ise, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerin kullanılmasıdır. Bakteriyosinler, genellikle sitoplazmik zarın geçirgenliğinde artış sağlayarak hedef hücreleri ortadan kaldıran ribozomal olarak sentezlenmiş peptitlerdir. Nisin, pediyosin, enterosin, plantirisin, diversin gibi bakteriyosinler gıda muhafaza uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

Bakteriyosinler “dost” antimikrobiyel ajanlar olarak tanımlanmakta ve herhangi bir halk sağlığı riskine neden olmamaktadır (13,231,258–260).

Garcia-Almandarez ve ark. (2008), *Lactobacillus lactis* UQ2 suşundan elde edilen ve spreyle kurutulmuş olan bakteriyosinin paslanmaz çelik kupon üzerinde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerine karşı etkinliklerini araştırmışlar ve bu bakteriyosinin *L. monocytogenes* biyofilmlerinde 5 log’luk bir azalma sağladığını gözlemlemişlerdir(256). Benzer şekilde, Winkelströter ve ark. (2011) *Lb. sakei* 1 tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde inhibe edici etkisini göstermişlerdir (261). Winkelströter ve ark. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada da *Lb. paraplantarum* FT259 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir. Yapılan mikroskopik değerlendirmede, *Lb. paraplantarum* FT259 tarafından üretilen plantarisinin *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerindeki güçlü bir inhibitör etkisi olduğu vurgulanmıştır (262).

Perez-ibarreche ve ark. (2016), 10°C’ de paslanmaz çelik ve politetrafloroetilen yüzeylerde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde *Lb. sakei* CRL1862 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin etkinliğini araştırmışlardır. *Lb. sakei* CRL1862 tarafından üretilen bakteriyosinin biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiği ve bu inhibisyon etkinliğinin politetrafloroetilen yüzeyler üzerinde paslanmaz çelik yüzeylere kıyasla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (263).

Biyofilmler ekonomik kayıplar ve sağlık riski oluşturması açısından gıda sanayinde önemli bir sorundur. Biyofilmler, hücrelerin yüzey ve ekipmanlarına tutunarak orada kolonize olup, salgıladıkları EPS madde ile korunaklı bir üç boyutlu yapı oluşturması ile karakterizedir. EPS’nin zayıflaması biyofilmin üç boyutlu yapısının bozulmasına ve yapının antibiyotik ve dezenfektanlara karşı hassas hale gelmesine neden olmaktadır. Bu üç boyutlu yapının stabilitesinin zaman ile doğru orantılı olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, gıda işleme yüzey ve ekipmanlarında belirli aralıklarla uygun bir dezenfeksiyon işleminin gerçekleştirilmesi; biyofilm yapısının ortamdaki kaldırılması, ekonomik kayıpların ve sağlık risklerinin önlenmesi bakımından oldukça önemli olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (9,168,252,264,265).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Tez çalışmasında,

- i) Ankara ve çevre ilçelerdeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen çiğ ve işlem görmüş gıda örnekleri, meyve ve sebze yıkama suları ile gıda işleme yüzeylerinden alınan sürüntü örnekleri izolasyon materyali olarak kullanılmış olup, bunlarda *L. monocytogenes* varlığının araştırılması,
- ii) İzole edilen suşların moleküler yöntemlerle tanımlanması,
- iii) Moleküler yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan suşların virülens gen bölgelerini içerip içermediğinin araştırılması,
- iv) *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma profillerinin tespit edilmesi,
- v) *L. monocytogenes* suşlarının virülens gen bölgesi içerme oranı ile biyofilm oluşturma özelliği arasında korelasyon olup olmadığının araştırılması,
- vi) Güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanan 3 adet *L. monocytogenes* suşu tarafından üretilen biyofilm yapısı üzerine gıda sanayinde yaygın olarak kullanımı tercih edilen dezanfektanların farklı konsantrasyonlarda, uygulama sürelerinde ve sıcaklıklarında etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

*L. monocytogenes*, çevrede yaygın olarak bulunan ve kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu ciddi klinik tablolara neden olabilen bir patojendir. Gıdada başlangıç *L. monocytogenes* yükü oldukça düşük olsa bile, gıdaların mikroorganizmanın gelişimini destekler nitelikte bir kompozisyona sahip olması ve etmenin buzdolabı sıcaklığında da çoğalmaya devam etmesi listeriyozis bakımından en büyük risk etmenleridir. Gıda üretim tesislerinde ve gıda hazırlama ekipmanlarında kontaminasyona neden olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, *L. monocytogenes* varlığının hızlı ve doğru olarak belirlenebilmesi ve bu patojenin kontaminasyonunu önleyebilecek önlemlerin alınması hem endüstriyel açıdan hem de toplum sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Benzer şekilde *L. monocytogenes* suşlarının virülens özelliklerinin belirlenmesi özellikle listeriyozis tedavisinde hedef alınabilecek kriterler olmaları açısından oldukça önemlidir. *L. monocytogenes* gibi biyofilm üreticisi bakteriler, gıda işleme ekipmanlarından ürettikleri biyofilm yapısı sayesinde gıdalara taşınarak birçok hastalığa yol açabilmektedirler. Gıda yüzeylerinde oluşan biyofilm, ortamdan uzaklaştırılması gereken potansiyel bir tehdit

oluşturmaktadır. Biyofilm yapısını ortamdan eradike edebilmek için endüstriyel süreçlerde uygun ve etkin dezenfektan kullanımı genellikle tercih edilmektedir.





## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1. MATERYAL**

#### **4.1.1. GIDA ÖRNEKLERİ**

Tez çalışmasında Ankara ve çevre ilçelerdeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen çiğ ve işlem görmüş gıda örnekleri, meyve ve sebze yıkama suları ile gıda işleme yüzeylerinden alınan sürüntü örnekleri *L. monocytogenes* varlığı açısından değerlendirilmiştir. Örnekler, aseptik koşullara dikkat edilerek tek kullanımlık steril kaplara alınmış ve soğuk zincir korunarak Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Laboratuvara ulaşan örnekler herhangi bir depolama işlemi uygulanmamış olup, aynı gün içinde izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

#### **4.1.2. KONTROL BAKTERİLERİ**

Tez çalışmasında *Listeria monocytogenes* ATCC7644 ve *Staphylococcus aureus* ATCC6538 suşları kontrol bakteri olarak kullanılmıştır. Kontrol bakterileri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

#### **4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASALLAR**

Tez çalışması kapsamında, kullanılan kimyasallar, besiyerleri, katkıları, moleküler çalışmalar için kullanılan kimyasallar EK 1’de verilmiştir.

#### **4.1.4. STOK KÜLTÜRLERİN HAZIRLANMASI**

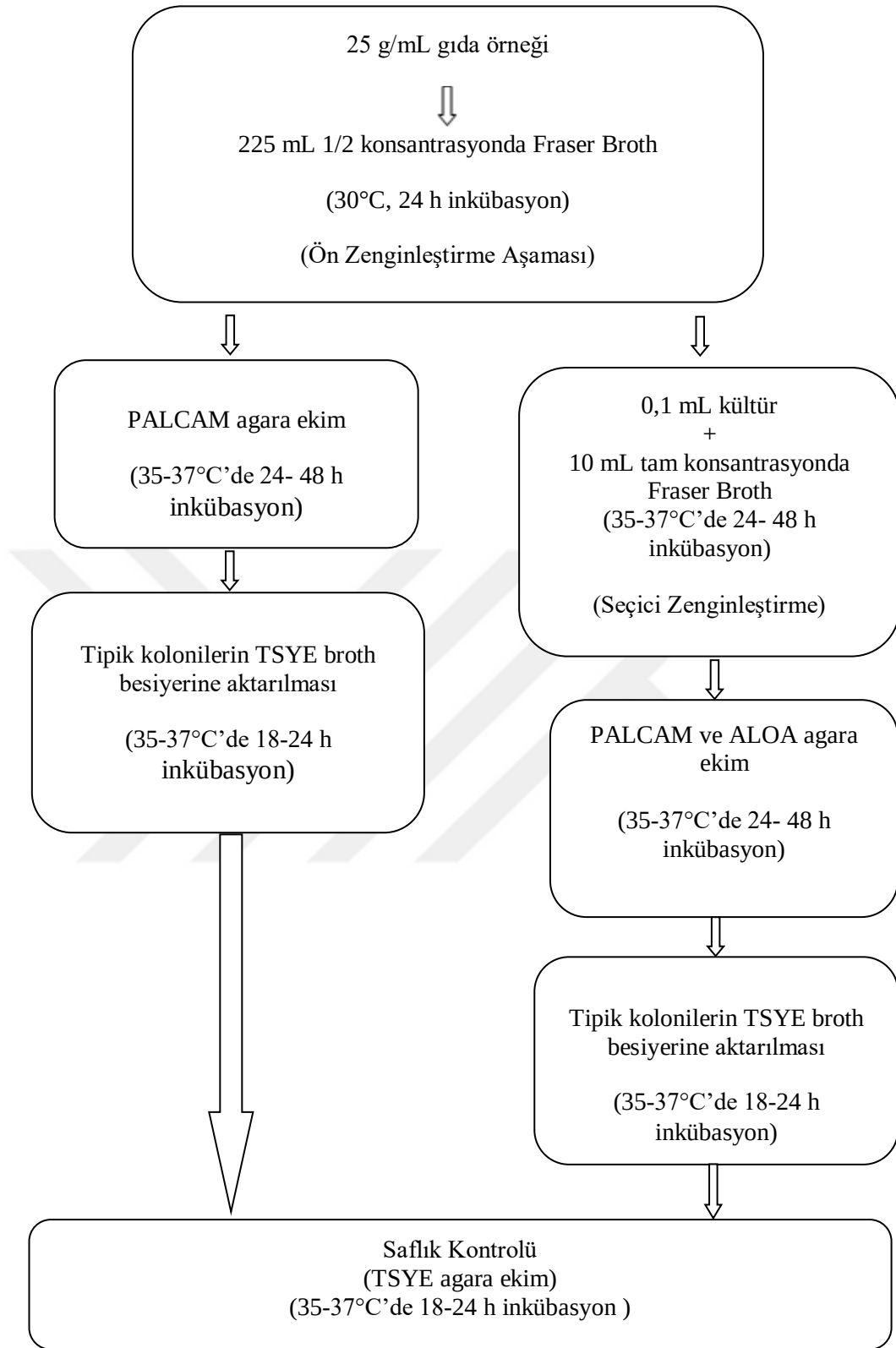
Tez çalışması kapsamında, gıdalardan izole edilen ve ön değerlendirmede muhtemel *Listeria* spp. olarak belirlenen izolatlar ve kontrol bakterileri %40 oranında steril gliserol ilave edilmiş Brain Heart Infusion (BHI) Broth ve Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) Broth ortamlarında -20°C’de muhafaza edilmiştir (78).

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. *LISTERIA* SPP. İZOLASYONU

*Listeria* spp.'nin izolasyonu için 2004 yılında revize edilmiş olan ISO 11290-1 yönteminden yararlanılmıştır. ISO 11290-1 yöntemine göre izolasyonu yapılacak örnekler öncelikle ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş, daha sonra ise selektif zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Son aşama da ise selektif katı besiyerine ekim yapılarak, oluşan koloni morfolojisi değerlendirilmiştir (78,81).

Gıda örnekleri steril kaplarda net ağırlıkları 25 g olacak şekilde tartılmıştır. Üzerine 225 mL steril yarı kuvvette Fraser Broth ilave edilmiştir. Homojenizasyon işlemi için, stomacher cihazından yararlanılmıştır. Elde edilen süspansiyonlar 28-30°C'de 24±2 h inkübe edilmiş ve böylece seçici olmayan ön zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşama olan selektif zenginleştirme için, yarı kuvvetteki Fraser Broth kültüründen 0,1 mL alınarak 10 mL tam kuvvette Fraser Broth besiyerine aktarılmış ve 35°C'de 48±2 h inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra tam kuvvette Fraser Broth besiyeri ortamlarından alınan örneklerden, öncelikle ALOA agara yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 35°C'de 24-48 h inkübe edilmiştir. Benzer şekilde kontrol amacıyla, yarı kuvvette ve tam kuvvetteki Fraser Broth besiyerinden, PALCAM agara yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve petriler 35°C'de 24-48 h inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda ALOA agar besiyerinde mavi-yeşil renkli opak zon oluşturan koloniler ile PALCAM agarda oluşan orta kısmı çökük siyah renkli koloniler muhtemel *Listeria* spp. olarak tespit edilmiştir. Her bir örnek için ALOA ve PALCAM agar ortamlarında tipik koloni morfolojisi gösteren tek koloni seçilerek, steril koşullarda TSYE broth besiyerine inoküle edilmiş ve 35°C'de 18-24 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra sıvı ortamdaki izolatlardan TSYE agar ortamına ekim yapılarak, saflık kontrolleri yapılmıştır. ISO 11290-1 yöntemi'nin akış şeması Şekil 4.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** ISO 11290-1 yöntemi akış şeması

#### 4.2.2. İZOLATLARIN MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI

Muhtemel *Listeria* spp. olarak değerlendirilen izolatlar, morfolojik ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur.

##### 4.2.2.1. Gram Boyama

Temiz (2000) tarafından önerilen yönteme uygun olarak gram boyama işlemi uygulanmıştır. Uygulanan boyama işleminin ardından lamın üzerindeki preparata, immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir. İncelenen örneklerden uçları yuvarlak, çubuk veya kokobasil morfolojisine sahip olanlar, Gram (+) olarak değerlendirilmiştir (266).

##### 4.2.2.2. Katalaz Testi

TSYE agar besiyerinde 35 C’de 18 h inkübe edilerek gelişimi sağlanan kolonilerden, lam üzerine tek bir koloni aktarılmıştır. Koloninin  zerine 2-3 damla %3’l k H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  z ltisi damlatılarak, gaz çıkışı olup olmadığı kontrol edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  z ltisi damlatıldığında kabarcık oluşuyorsa test pozitif olarak, aksi durumda ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (266). *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pozitif kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

##### 4.2.2.3. Oksidaz Testi

TSYE agar besiyerinde 35 C’de 18 h süreyle inkübe edilerek gelişimi sağlanan kolonilerden, steril  ze ile bir koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler oksidaz test kitindeki (Bactident Oxidase) test çubuklarının üzerine sürülmüştür. 60 saniye içerisinde test çubuklarında renk değişiminin gözlenmesi pozitif sonuç, renk değişiminin olmaması ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol bakteri olarak *Listeria monocytogenes* ATCC7644 suşu kullanılmıştır.

##### 4.2.2.4. Hareketlilik Testi

TSYE agar besiyerinde 35 C’de 18 h inkübe edilerek gelişimi sağlanan kolonilerden bir tanesi, iğne uçlu steril  ze yardımıyla alınmıştır. Yarı katı özellikteki SIM agar (%0,7 agar

oranı) ortamına, kültür ile kontamine olan öze dik bir şekilde batırılarak inokülasyon sağlanmıştır. 28°C’de 48 h’lik inkübasyon işleminin ardından, ekim çizgisinin yakınlarında ve besiyeri yüzeyine yakın bir bölgede şemsiye şeklindeki görüntü, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC7644 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **4.2.2.5. *Listeria* spp. İzolatlarının Stoklarının Alınması**

Gr (+), katalaz (+), oksidaz (-) ve hareket testi (+) olan çubuk şeklindeki izolatlar muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanmıştır. %40 oranında steril gliserol ilave edilmiş BHI broth ve TSYE broth ortamlarında ayrı ayrı olacak şekilde stok kültürleri hazırlanarak -20°C’de muhafaza edilmiştir (78,267).

### **4.2.3. *LISTERIA* SPP. İZOLATLARININ MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI**

Biyokimyasal tanımlamaya göre muhtemel *Listeria* spp. izolatları olarak tanımlanan suşlar, 16S rRNA dizi analizine tabi tutulmuştur (268).

#### **4.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu**

Çalışmamızda genomik DNA izolasyonu için Exgene Tissue SV (GenAll, Katolog No: 104-101) kitinden yararlanılmıştır. Protokolü takip edilen test kiti; lizis solüsyonu, proteinaz K, RNaz A, yıkama çözeltisi I, yıkama çözeltisi II ve Elüsyon solüsyonu içermektedir. Genomik DNA izolasyon protokolü aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır.

1. Bakteri kültürleri TSYE broth ortamında 37°C’de 18 h geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri kültürleri 1,5 mL hacmindeki steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. 6000 devirde 10 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanmış ve üst sıvı ortamı uzaklaştırılmıştır.
3. Dipte kalan pellet kısmı üzerine 200 µL Gram (+) bakteriler için hazırlanmış olan Lizis Tamponu ilave edilmiş ve tampon çözelti içinde pelet çözündürülerek 37°C’de 30 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
4. İnkübasyon işleminin ardından örnek üzerine 200 µL Lizis solüsyonu ve 20 µL proteinaz K solüsyonu eklenmiştir. Nihai ortamın vorteks yardımıyla karışması

sağlanmıştır. Bakteriyel hücrelerin tamamen parçalanmasının amaçlandığı bu aşamada, elde edilen çözelti 56°C'ye ayarlı sıcak su banyosunda ara sıra karıştırılmak suretiyle yaklaşık olarak 30 dk inkübe edilmiştir.

5. Sıcak su banyosundan alınan örnekler üzerine 20 µL RNaz A çözeltisi ilave edilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Bu ortam oda sıcaklığı koşullarında 10 dk boyunca inkübe edilmiştir.
6. Çözeltiye %50 konsantrasyondaki etanolden 400 µL aktarılmış ve bu ortamın tamamen karışması sağlanmıştır.
7. Kit içerisinde bulunan kolonlara elde olunan lizat aktarılmış ve daha sonra 8000 devirde 1 dk süreyle santrifüj edilmiştir.
8. Kolon üzerine sırasıyla 500 µL hacminde yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II aktarılmıştır.
9. Bu işlemlerin ardından 8000 devirde 3 dk boyunca uygulanan santrifüj işlemi ile çözeltilerin kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır.
10. Kolon 1,5 mL hacmindeki steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerine 200 µL elüsyon solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 2 dk inkübe edilen ortamlara, 14000 devirde 1 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır.
11. Son aşamada steril ependorf tüplerinde toplanan DNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

#### **Liziz Tampon Çözeltisinin Hazırlanması**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-Hidroklorür | 0,32 g |
| EDTA             | 0,08 g |
| Triton X 100     | 1,2 mL |
| Destile su       | 100 mL |

(pH: 8,0; kullanımdan hemen önce 20 mg/mL lizozim çözeltisi eklenmiştir)

#### **Lizozim Çözeltisinin Hazırlanması**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Lizozim           | 1 g   |
| Steril destile su | 10 mL |

Steril destile su ve lizozim tamamen karıştırılmıştır. 45 µm'lik steril membran filtre ile filtrasyon işlemi uygulanarak, ortamın sterilizasyonu sağlanmıştır.

#### 4.2.3.2. 16S rRNA Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

16S rRNA gen bölgesinin PZR reaksiyonu için, Applied Biosystems™ ProFlex Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında 16S ileri (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3') ve 16S geri (3'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -5') evrensel primer dizileri kullanılmıştır (268). Toplam 50 µL hacimde olacak şekilde ve Çizelge 4.1.'de belirtilen miktarlarda PZR karışımı hazırlanmıştır.

**Çizelge 4.1.** Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Moleküler destile su             | 34,75 µL |
| PZR tamponu                      | 5µL      |
| dNTP (2 mM)                      | 1 µL     |
| 16S ileri primer                 | 1µL      |
| 16S geri primer                  | 1 µL     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)        | 4 µL     |
| Taq DNA polimeraz enzimi (5U/mL) | 0,25 µL  |
| Genomik DNA                      | 3 µL     |
| <b>TOPLAM HACİM</b>              | 50 µL    |

Hazırlanan 50 µL hacmindeki PZR karışımı, steril 0,2 mL'lik PZR tüplerine aktarılmıştır. PZR tüpleri cihazdaki kuyucuklara yerleştirilerek, bir çevrimi 95°C'de 5 dk (denatürasyon), 95°C'de 30 saniye (çift zincirin açılması), 55°C'de 30 saniye (primerlerin bağlanması), 72°C'de 30 saniye (zincir uzaması) ve 72°C'de 5 dk (son uzama) olarak gerçekleştirilen toplam 35 döngülük PZR protokolü uygulanmıştır (269). Son aşamada ise, elde edilen PZR ürünlerinin saflaştırılmasında GeneJET PZR Purifikasyon Kiti kullanılmıştır.

#### 4.2.3.3. 16S rRNA Gen Bölgelerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

PZR'de amplifiye edilen gen bölgelerinin elektrofrez için, %1 agoroz içeren jel hazırlanmıştır. Agaroz jeli hazırlanmak amacıyla, 1 g agoroz 100 mL 1X Tris-Asetat elektrofrez tamponu (TEB) içine aktarılmıştır. Mikrodalga fırın yardımıyla jel içeriğinin

tamamen çözünmesi sağlanmış ve jelin oda sıcaklığında 45-50°C'ye kadar soğuması beklenilmiştir. Daha sonra jel ortamı elektroforez tankına dökülmüş ve akışkan haldeki jel içine elektroforez tarakları yerleştirilmiştir. Jel içerisindeki agarozun polimerize olmasını sağlamak amacıyla, oda sıcaklığında 30-40 dk beklenmiştir. Agarozun polimerizasyonu sağlandıktan sonra elektroforez tankına jelin üzerini tamamen kapatacak miktarda TBE tampon eklenmiştir. Elektroforez tarakları jele zarar vermeden hafifçe hareket ettirilmek suretiyle alınmıştır. Agaroz jel üzerindeki ilk kuyucuğa 2 µL 1 kb'lık DNA ladder marker yüklenmiştir. Devamındaki diğer kuyucuklara ise araştırılan örneklerden sırasıyla 10'ar µL DNA örneği ile 2µL 6X DNA yükleme boyası karışımları dikkatlice yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 110 V'luk elektrik akımında 40-45 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Marker boyanın agaroz jel sistemini terk etmesinden sonra, elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Ortamdan alınan jeller 0,2 µg/mL etidyum bromür içeren TBE tampon içine aktarılarak, yaklaşık 60 dk boyunca beklenmiştir (270). Boyanan DNA bantları 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında translüminatör kullanılarak incelenmiş ve agaroz jeller Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak fotoğraflanmıştır.

#### **DNA Ladder Marker Çözeltilisinin Hazırlanması**

|                       |      |
|-----------------------|------|
| DNA ladder            | 1 µL |
| 6X DNA yükleme boyası | 1 µL |
| Deiyonize su          | 4 µL |

#### **Tris-Asetat Tamponu (1X) (TEB) Hazırlanması**

|               |           |
|---------------|-----------|
| Tris          | 4,84 g    |
| Sodyum Asetat | 4,08 g    |
| EDTA          | 0,37 g    |
| Destile Su    | 1000 mL   |
| pH            | 8,0 ±0,02 |

#### **4.2.3.4. PZR Ürünlerinin Dizilenmesi ve Değerlendirilmesi**

16S rRNA gen bölgesine ait PZR ürünlerinin çift yönlü DNA dizi analizi, hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçları BLAST (Basic Local Alingment Search Tool/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web>) programına aktarılmış ve *Listeria* spp. için



NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yer alan diziler ile benzerliği karşılaştırılmıştır. Benzerlik yüzdesi kontrol edilerek, aranan dizi sırasının hangi türe ait olabileceği belirlenmiştir.

#### 4.2.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ

16S rRNA dizi analizleri sonucunda *L. monocytogenes* olarak tanımlanan suşlarda, patojenitede öne çıkan virülens gen bölgeleri saptanmıştır. Tez çalışması kapsamında *hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA* ve *flaA* olmak üzere toplam 7 virülens gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır (Çizelge 4.2.).

**Çizelge 4.2.** Virülens gen bölgelerini saptamak için kullanılan primer dizileri

| Gen Bölgesi | Primer Dizisi               | Tm (°C) | Kaynak |
|-------------|-----------------------------|---------|--------|
| <i>hlyA</i> | F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA | 64      | (271)  |
|             | R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG |         |        |
| <i>actA</i> | F: TAGCGTATCACGAGGAGG       | 56      | (272)  |
|             | R: TTTTGAATTTTCATATCATTCACC |         |        |
| <i>inlA</i> | F: CAGGCAGCTACAATTACACA     | 55      | (272)  |
|             | R: ATATAGTCCGAAAACCACATCT   |         |        |
| <i>fbp</i>  | F: TGAAAGAGTTTATCGAGCCATACC | 59      | (273)  |
|             | R: CTTATGCTCCTCTAGTACACTTT  |         |        |
| <i>iap</i>  | F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG     | 59      | (272)  |
|             | R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA     |         |        |
| <i>prfA</i> | F: CCCCAAGTAGCAGGACATGCTAA  | 62      | (272)  |
|             | R: GGTATCACAAAGCTCACGAG     |         |        |
| <i>flaA</i> | F: AGCTCTTAGCTCCATGAGTT     | 55      | (272)  |
|             | R: AGTAGCAGCACCTGTAGCAGT    |         |        |

##### 4.2.4.1. *Listeria monocytogenes* Suşlarında Genomik DNA İzolasyonu

Virülens gen bölgelerinin genomik DNA’da varlığının saptanması amacıyla, öncelikli olarak *L. monocytogenes* suşlarında genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla “4.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu” başlığı altında yer alan protokolün aynısı takip edilmiştir.

##### 4.2.4.2. Virülens Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

*L. monocytogenes* suşlarında virülens gen bölgelerinin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması işlemi, “4.2.3.2. 16S rRNA Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile

Çoğaltılması” başlığı altında verilen protokol takip edilmiştir. Ancak 16S rRNA primerleri yerine virülens gen bölgelerine ait primerler ve Çizelge 4.2’de verilen Tm değerleri kullanılmıştır.

#### **4.2.4.3. Virülens Gen Bölgelerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Varlığının Görüntülenmesi**

*L. monocytogenes* suşlarında virülens gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezinde varlığının görüntülenmesi amacıyla, “4.2.3.3. 16S rRNA Gen Bölgelerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi” başlığı altında verilen protokol uygulanmıştır. Ancak virülens gen bölgelerinin büyüklüklerinin saptanması amacıyla, 2 kb’lık DNA ladder marker kullanılmıştır.

#### **4.2.5. LISTERIA MONOCYTOGENS SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmasında 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *L. monocytogenes* olarak tanımlanan suşlar ile *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşunda biyofilm oluşturma özelliği test edilmiştir. Biyofilm aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, polisistren mikrotitre plakaları kullanılmış ve Stepanovic vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır (274). Bu kapsamda her bir suşun 24 h, 48 h ve 72 h’lerindeki biyofilm oluşturma kapasitesi araştırılmış ve farklı saat aralıkları için ayrı mikropalaklar hazırlanmıştır. Bu amaçla her suş için üç paralel ve her bir paralel içinde üç tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu steril mikropalalara 230 µL steril TSYE broth besiyeri ve 20 µL 18 h’lik bakteri kültürü inoküle edilmiştir. Kültür süspansiyonunun yoğunluğu 0,5 McFarland ( $1 \times 10^6$  KOB/mL) standardına uygun bulanıklıkta olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol kuyucuğuna ise, sadece steril TSYE broth besiyeri eklenmiştir. Mikropalak ortamları aerobik ortamda 35°C’de 24 h, 48 h ve 72 h boyunca inkübe edilmiştir. Her bir inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuk 3 kere steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffer Saline (PBS); pH: 7,2) ile yıkanmıştır. Kuyucukların tabanına tutunan bakteriler 250 µL %99’luk metanol kullanılarak sabitlenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk’lık inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardan metanol uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığında tekrardan kurumaya bırakılan mikropalaklar üzerine, daha sonra 250 µL %1’lik kristal viyole ilave edilmiştir. Oda

sıcaklığında 25-30 dk boyunca boyanın biyofilm tabakasına bağlanması amacıyla inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra mikropalaklar steril destile su ile boya kalıntısı kalmadığından emin oluncaya kadar yıkanmıştır. Mikropalak ortamları tekrardan oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve sonrasında ise biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi amacıyla 250 µL %33'lük glasiyel asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD: Optical Density) spektrofotometrede (Shimadzu Spektrophotometer, Japan) 570 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerlerinin ortalaması alınmıştır. Christensen vd. (1985) tarafından önerilen protokole uygun olarak, suşların biyofilm oluşturma derecesi güçlü, orta ve zayıf olarak hesaplanmıştır (275). Protokole göre yapılan hesaplamalar aşağıda yer almaktadır.

|                                                          |   |                       |
|----------------------------------------------------------|---|-----------------------|
| $(OD) < (OD \times c)$                                   | → | biyofilm oluşturmuyor |
| $(OD \times c) < (OD) < (2 \times OD \times c)$          | → | zayıf biyofilm yapısı |
| $(2 \times OD \times c) < (OD) < (4 \times OD \times c)$ | → | orta biyofilm yapısı  |
| $(4 \times OD \times c) < (OD \times c)$                 | → | güçlü biyofilm yapısı |

c: Negatif kontrol kuyucuğunun standart sapma değeri

#### **PBS (10X PBS- 1M) çözeltisinin hazırlanması**

|                                                     |        |
|-----------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                | 80 g   |
| KCl                                                 | 2 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 18,1 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 2,4 g  |
| Toplam Hacim                                        | 1 L    |

#### **4.2.6. PERASETİK ASİT VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN GÜÇLÜ BİYOFİLM ÜRETİCİSİ *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmasının bundan sonraki aşamasında 96 kuyucuklu mikroplakta güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanan üç adet *L. monocytogenes* suşu ile *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşu kullanılarak devam edilmiştir.

##### **4.2.6.1. *Listeria monocytogenes* Suşlarının Paslanmaz Çelik Kuponlar Üzerinde Biyofilm Oluşturma Özelliği ve Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Biyofilm Hücreleri Üzerinde Etkinliğinin Belirlenmesi**

###### **4.2.6.1.1. *Listeria monocytogenes* Suşlarının Paslanmaz Çelik Kuponlar Üzerinde Biyofilm Oluşturma Özelliği**

Güçlü biyofilm üreticisi olarak seçilen üç *L. monocytogenes* suşu ile *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşunun, gıda işletmelerinde kullanımı geniş ölçüde tercih edilen paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm oluşturma düzeyi farklı sürelerde test edilmiştir. Bu amaç için Giaouris ve ark.(2005) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek takip edilmiştir (276). Bu amaç için 2,5×0,8×0,1 cm boyutlarındaki paslanmaz çelik kuponlar (316L kalite paslanmaz çelik) kullanılmıştır (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2..** Tez çalışmasında kullanılan paslanmaz çelik kupon (uzunluk 2,5 cm, genişlik 0,8 cm ve yükseklik 0,1 cm)

Paslanmaz çelik kuponlar, çalışma öncesinde bir gece boyunca aseton çözeltisi içinde bekletilmiştir. Aseton çözeltisinden çıkarılan çelik kuponlar bu sefer 40-45 dk boyunca dezenfektanlı suda bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra çelik kuponlar musluk suyu ile yıkanmıştır. Bu işlem sonrasında çelik kuponlar üç kez destile suya batırılıp çıkarılmak suretiyle yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır. En son aşamada ise, çelik kuponlar alüminyum folyo ile tek tek sarılarak 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Benzer şekilde paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde oluşan biyofilm yapısını parçalamak amacıyla kullanılacak olan cam boncuklar da 5 mL serum fizyolojik içeren tüplere koyulmadan önce ve koyulduktan sonra olmak üzere toplamda iki sefer 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Tez çalışmasına dahil edilen *L. monocytogenes* suşları ve kontrol suş, 5 mL steril TSYE broth içerisine 100 µL hacimde olacak şekilde inoküle edilmiş ve 37°C'de 18 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kültürlerin başlangıç konsantrasyonları 10<sup>8</sup> KOB/mL olacak şekilde spektrometrede ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanmış kültür ortamından 1 mL alınarak, içinde çelik kupon bulunduran 5 mL hacmindeki steril TSYE broth besiyerlerine inoküle edilmiştir. Bu karışım 37°C'de 48 h ve 72 h boyunca inkübe edilmiştir. İçine kültür inoküle edilmemiş olan ve çelik kupon içeren 5 mL hacmindeki steril TSYE broth besiyerleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda, aseptik koşullar altında çelik kuponlar bakteri süspansiyonlarını içeren ortamlardan alınarak steril boş deney tüplerine aktarılmış ve 10 dk kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan çelik kuponlar iki kez 10 mL steril PBS (pH 7,2) içeren tüplere daldırılıp çıkartılmıştır. Bu aşamada çelik kuponlar üzerinde bulunan ve yüzeye tutunamamış bakterilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son daldırmayı takiben çelik kuponlar 5 mL hacminde olan ve içinde toplam 5 adet cam boncuk (r: 3 mm) bulunan steril serum fizyolojik su içerisine aktarılmıştır (Şekil 4.3). Tüpler vortex aracılığıyla mümkün olan en yüksek devirde yaklaşık 2 dk boyunca karıştırılmıştır. Cam boncukla vorteksleme işleminin ardından bakteri hücre sayısını belirlemek amacıyla, bir seri dilüsyon işlemi uygulanmıştır. Her bir dilüsyondan TSYE agar ortamlarına yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 18-24 h'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda uygun sayıda koloni barındıran petriler sayılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır (276).



**Şekil 4.3.** Çelik kuponların cam boncuklu serum fizyolojik içeren tüplere aktarılması

#### **4.2.6.1.2. Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşan Biyofilm Tabakası Üzerinde Etkinliğinin Belirlenmesi**

PAA ve QAC gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan ve etkinlik düzeyi yüksek olan dezenfektanlar arasındadır. Biyofilm yapısı üzerinde PAA ve QAC'nin etkinlik düzeyleri farklı konsantrasyonlarda (%0,1, %0,2 ve %0,3), farklı sürelerde (90 ve 120 saniye) ve farklı sıcaklık derecelerinde (25°C ve 37°C) test edilmiştir (207). Test edilecek her bir parametre için üç paralelli olacak şekilde çalışma yürütülmüştür.

PAA ve QAC'nin %0,1, %0,2 ve %0,3 konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Üzerinde biyofilm yapısı bulunan paslanmaz çelik kuponlardan her biri, tüplere tek tek dağıtılmıştır. Bu ortamlar 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında 90 ve 120 saniye boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda çelik kuponlar steril PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Böylelikle dezenfektan kalıntıları ile çelik kupon üzerinden eradike edilen patojenler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından çelik kuponlar 5 mL hacmindeki ve içinde toplam 5 adet cam boncuk bulunan steril serum fizyolojik su içerisine aktarılmıştır. Cam boncuk içeren bu ortamlar mümkün olabilecek en yüksek devirde yaklaşık 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Vorteksleme işlemi ile çelik kupon üzerinde tutunmuş olan canlı hücrelerin serum fizyolojik çözeltisine geçmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından bakteri hücre sayısını belirlemek amacıyla, bir seri dilüsyon işlemi

uygulanmıştır. Her bir dilüsyondan TSYE agar ortamlarına yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 18-24 h'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda uygun sayıda koloni barındıran petriler sayılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır (276). Çalışmada PAA ile QAC uygulanmamış ve içinde metal boncuklar ile çelik kupon bulunan serum fizyolojik su ortamları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir petrideki canlı hücre sayısı, pozitif kontrol ortamlarıyla karşılaştırılarak, farklı doz, sıcaklık ve sürede dezenfektan uygulamasının biyofilm üreticisi canlı hücreler üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

PAA ve QAC uygulaması sonucunda paslanmaz çelik kuponlardaki cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısını hesaplamak için aşağıda verilen formülasyon kullanılmıştır:

cm<sup>2</sup> başına düşen koloni sayısı = (sayılan koloni sayısı × seyreltme faktörü × mL başına düşen koloni sayısı) / çelik kuponun alanı

Bilinen değerler yerine konulduğu zaman oluşan formül ise;

cm<sup>2</sup> başına düşen koloni sayısı = (sayılan koloni × 10 × 5) / 4,66 cm<sup>2</sup>

#### **4.2.6.2. *Listeria monocytogenes* Suşlarının 96 Kuyucuklu Mikroplaklarda Oluşan Biyofilm Yapısı Üzerine Perasetik Asit ile Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Etkinliğinin Belirlenmesi**

Üç *L. monocytogenes* suşu ile kontrol suşunun 96 kuyucuklu mikroplakta oluşturduğu biyofilm yapısını eradike edebilmek için Stepanovic ve ark. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır (274). Biyofilm oluşumunu için öncelikli olarak 96 kuyucuklu steril mikroplaklara 230 µL steril TSYE broth besiyeri ve 20 µL 18 h'lik bakteri kültürü inoküle edilmiştir. Kültür süspansiyonunun yoğunluğu 1×10<sup>8</sup> KOB/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol kuyucuğuna ise, sadece steril TSYE broth besiyeri eklenmiştir. Mikroplak ortamları aerobik ortamda 35°C'de 48 h ve 72 h boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve bu ortamlar 3 kere steril PBS ile yıkanmıştır.

PAA ve QAC'nin %0,1, %0,2 ve %0,3 konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve her bir konsantrasyondan ayrı ayrı olacak şekilde biyofilm yapısı içeren mikroplak ortamlarına

250 µL aktarılmıştır. Her bir mikropalak ortamları 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında 90 ve 120 saniye boyunca inkübe edilmiştir. Test edilecek her bir parametre için üç paralelli olacak şekilde çalışma yürütülmüştür. Uygulama süreleri sonunda kuyucuklardaki PAA ve QAC çözeltileri mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuk 250 µL steril PBS ile yıkanmıştır. Pozitif kontrol kuyucukları PAA VE QAC uygulamasına tabi tutulmamış olup, bu kuyular sadece 250 µL steril PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklardaki PBS uzaklaştırılmış ve kuyucukların kuruması için oda sıcaklığında yaklaşık 30-35 dk beklenmiştir. Yıkama işleminden sonra, kuyucukların tabanında tutunmuş olarak kalan bakteriler, 250 µL %99'luk metanol çözeltisi kullanılarak sabitlenmiş ve bu ortam 15-20 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuklardan metanol uzaklaştırılmış ve yine mikropalak ortamları oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında ise biyofilm yapısını boyamak için kuyucuklara %1'lik 250 µL kristal viyole eklenmiştir. 15-20 dk'lık bekleme süresi sonunda kuyucuklarda bulunan boyanın uzaklaştırılması için mikropalak ortamları distile su ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında kuruyan mikropalaklarda biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi amacıyla, %33'lük 250 µL glasiyel asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Her bir kuyucuğun OD değeri spektrofotometrede 570 nm'de ölçülmüş ve OD değerlerinin ortalaması alınmıştır.

Pozitif kontrole göre biyofilm yapısının eradikasyon yüzdesi hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar aşağıda gösterilmiştir.

**Pozitif Kontrol Ortalama:**  $(\text{Pozitif kontrol}_1 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) + (\text{Pozitif kontrol}_2 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) + (\text{Pozitif kontrol}_3 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) / 3$

**Test Kuyucuğu Ortalama:**  $(\text{Test Kuyucuğu}_1 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) + (\text{Test Kuyucuğu}_2 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) + (\text{Test Kuyucuğu}_3 - \text{Negatif Kontrol Ortalama}) / 3$

**Pozitif Kontrole Göre Biyofilm Yapısı Eradikasyon Yüzdesi:**  $100 \times (\text{Pozitif Kontrol Ortalama} - \text{Test Kuyucuğu Ortalama}) / \text{Pozitif Kontrol Ortalama}$

#### 4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez çalışması kapsamında, *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma dereceleri ile virülens genleri bulundurma arasındaki ilişkiyi test etmek için ki-kare analizi



uygulanmıştır. Farklı dezenfektan uygulamalarının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin saptanmasında ise, bağımsız iki örneklem t testi ve ANOVA testi uygulanmıştır.



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

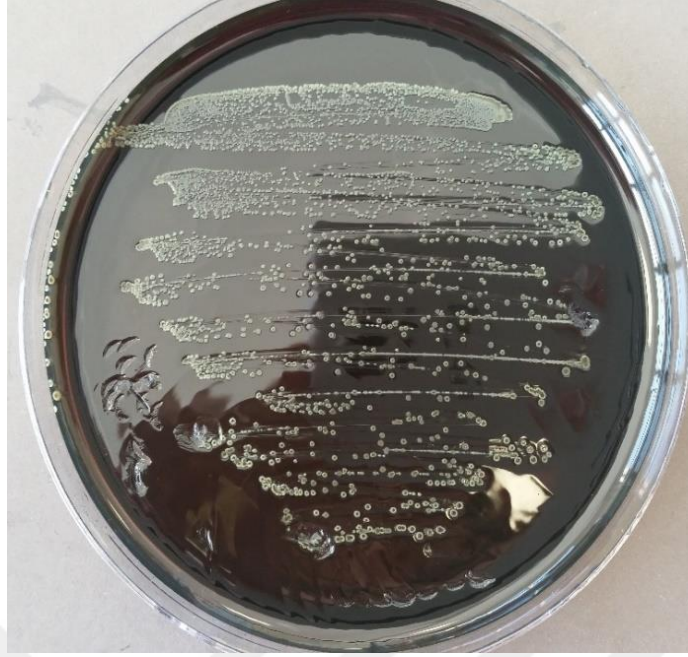
### 5.1. *LISTERIA* SPP. İZOLASYONU

Tez çalışması kapsamında Nisan 2019 – Şubat 2020 tarihleri arasında Ankara ve çevre ilçelerdeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen çiğ ve işlem görmüş gıda örnekleri, meyve ve sebze yıkama suları ile gıda işleme yüzeylerinden alınan sürüntü örnekleri (5×5 cm<sup>2</sup>'lik yüzey alanından) *L. monocytogenes* varlığı açısından analiz edilmiştir. Tez çalışmamızda 88'i tüketime hazır gıda, 32'si meyve ve sebze yıkama suyu, 17'si çiğ kırmızı et, 15'i yüzey swap örneği, 15'i çiğ süt ve 13'ü çiğ tavuk eti olmak üzere toplam 180 adet izolasyon materyalinde *Listeria* spp. varlığı ISO 11290-1 protokolü doğrultusunda analiz edilmiştir.

ISO 11290-1 protokolü gereğince, ALOA agar besiyerinde mavi-yeşil renkli ve etrafında opak zon oluşturan koloniler (Şekil 5.1.) ile PALCAM agar besiyerinde siyah-gri renkli ortası çökük koloniler (Şekil 5.2.) muhtemel *Listeria* spp. izolatu olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.1. ALOA agar üzerinde muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının koloni morfolojisi



**Şekil 5.2.** PALCAM agar üzerinde muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının koloni morfolojisi  
*Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan toplam 180 adet izolasyon materyalinden 71 tanesinde, ALOA ve PALCAM agar ortamlarında tipik koloni oluşumu gözlemlenmiştir (Çizelge 5.1.).

**Çizelge 5.1.** Tez çalışması kapsamında *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler

| No | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|----|--------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 1  | HL1          | 15.04.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 2  | HL2          | 15.04.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 3  | HL3          | 16.04.2019       | Kokoreç           | +                                          |
| 4  | HL4          | 17.04.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 5  | HL5          | 17.04.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 6  | HL6          | 17.04.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 7  | HL7          | 18.04.2019       | Et Döner          | -                                          |
| 8  | HL8          | 18.04.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 9  | HL9          | 19.04.2019       | Tavuk Döner       | -                                          |
| 10 | HL10         | 24.04.2019       | Et Sote           | -                                          |
| 11 | HL11         | 24.04.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 12 | HL12         | 24.04.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 13 | HL13         | 25.04.2019       | Lahana Sarması    | -                                          |
| 14 | HL14         | 25.04.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 15 | HL15         | 26.04.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 16 | HL16         | 30.04.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 17 | HL17         | 02.05.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | +                                          |
| 18 | HL18         | 02.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 19 | HL19         | 03.05.2019       | Kokoreç           | +                                          |
| 20 | HL20         | 07.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 21 | HL21         | 08.05.2019       | Midye Dolma       | -                                          |
| 22 | HL22         | 08.05.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 23 | HL23         | 09.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 24 | HL24         | 13.05.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 25 | HL25         | 13.05.2019       | Acılı Ezme        | -                                          |
| 26 | HL26         | 13.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 27 | HL27         | 15.05.2019       | İtalyan Salatası  | +                                          |
| 28 | HL28         | 16.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 29 | HL29         | 17.05.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 30 | HL30         | 17.05.2019       | Köfte Ekmek       | -                                          |
| 31 | HL31         | 21.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | +                                          |
| 32 | HL32         | 22.05.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 33 | HL33         | 22.05.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 34 | HL34         | 27.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 35 | HL35         | 27.05.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 36 | HL36         | 28.05.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 37 | HL37         | 28.05.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 38 | HL38         | 29.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 39 | HL39         | 30.05.2019       | Köfte Ekmek       | -                                          |
| 40 | HL40         | 30.05.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |

**Çizelge 5.1. (devam)** Tez çalışması kapsamında *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler

| No | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|----|--------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 41 | HL41         | 31.05.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 42 | HL42         | 31.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 43 | HL43         | 11.06.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 44 | HL44         | 11.06.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 45 | HL45         | 11.06.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 46 | HL46         | 12.06.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 47 | HL47         | 13.06.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 48 | HL48         | 13.06.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 49 | HL49         | 13.06.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 50 | HL50         | 17.06.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 51 | HL51         | 19.06.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 52 | HL52         | 20.06.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 53 | HL53         | 20.06.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 54 | HL54         | 24.06.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 55 | HL55         | 24.06.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 56 | HL56         | 24.06.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 57 | HL57         | 25.06.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 58 | HL58         | 26.06.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 59 | HL59         | 27.06.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 60 | HL60         | 27.06.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 61 | HL61         | 28.06.2019       | Şakşuka           | -                                          |
| 62 | HL62         | 01.07.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 63 | HL63         | 01.07.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 64 | HL64         | 01.07.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 65 | HL65         | 01.07.2019       | Mevsim Salatası   | +                                          |
| 66 | HL66         | 02.07.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 67 | HL67         | 02.07.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 68 | HL68         | 02.07.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 69 | HL69         | 03.07.2019       | Acısız Çiğ Köfte  | +                                          |
| 70 | HL70         | 03.07.2019       | Lahana Dolması    | -                                          |
| 71 | HL71         | 04.07.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 72 | HL72         | 04.07.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 73 | HL73         | 04.07.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 74 | HL74         | 05.07.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 75 | HL75         | 05.07.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 76 | HL76         | 08.07.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | +                                          |
| 77 | HL77         | 08.07.2019       | Acılı Ezme        | -                                          |
| 78 | HL78         | 08.07.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 79 | HL79         | 08.07.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 80 | HL80         | 09.07.2019       | İtalyan Salatası  | +                                          |

**Çizelge 5.1. (devam)** Tez çalışması kapsamında *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler

| No  | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|-----|--------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 81  | HL81         | 09.07.2019       | İtalyan Salatası  | +                                          |
| 82  | HL82         | 09.07.2019       | Çiğ Köfte         | -                                          |
| 83  | HL83         | 10.07.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 84  | HL84         | 10.07.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | +                                          |
| 85  | HL85         | 10.07.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 86  | HL86         | 17.07.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 87  | HL87         | 17.07.2019       | Acılı Ezme        | -                                          |
| 88  | HL88         | 17.07.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 89  | HL89         | 18.07.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 90  | HL90         | 18.07.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 91  | HL91         | 18.07.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 92  | HL92         | 22.07.2019       | Pastırma          | -                                          |
| 93  | HL93         | 22.07.2019       | Salam             | -                                          |
| 94  | HL94         | 23.07.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 95  | HL95         | 23.07.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | +                                          |
| 96  | HL96         | 23.07.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 97  | HL97         | 23.07.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 98  | HL98         | 24.07.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 99  | HL99         | 25.07.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 100 | HL100        | 29.07.2019       | Midye Dolma       | +                                          |
| 101 | HL101        | 30.07.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 102 | HL102        | 31.07.2019       | Mercimek Köftesi  | -                                          |
| 103 | HL103        | 31.07.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 104 | HL104        | 05.08.2019       | Tavuk Döner       | -                                          |
| 105 | HL105        | 05.08.2019       | Çiğ Süt           | +                                          |
| 106 | HL106        | 06.08.2019       | Tavuk Döner       | -                                          |
| 107 | HL107        | 07.08.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 108 | HL108        | 08.08.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 109 | HL109        | 08.08.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 110 | HL110        | 08.08.2019       | Mercimek Köftesi  | -                                          |
| 111 | HL111        | 15.04.2019       | Çiğ Süt           | +                                          |
| 112 | HL112        | 15.04.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 113 | HL113        | 16.04.2019       | Kokoreç           | +                                          |
| 114 | HL114        | 17.04.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 115 | HL115        | 17.04.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 116 | HL116        | 17.04.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 117 | HL117        | 18.04.2019       | Et Döner          | -                                          |
| 118 | HL118        | 18.04.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 119 | HL119        | 19.04.2019       | Tavuk Döner       | +                                          |
| 120 | HL120        | 24.04.2019       | Et Sote           | -                                          |

**Çizelge 5.1. (devam)** Tez çalışması kapsamında *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler

| No  | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|-----|--------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 121 | HL121        | 24.04.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 122 | HL122        | 24.04.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 123 | HL123        | 25.04.2019       | Lahana Sarması    | -                                          |
| 124 | HL124        | 25.04.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 125 | HL125        | 26.04.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 126 | HL126        | 30.04.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 127 | HL127        | 02.05.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 128 | HL128        | 02.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 129 | HL129        | 03.05.2019       | Kokoreç           | +                                          |
| 130 | HL130        | 07.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | +                                          |
| 131 | HL131        | 08.05.2019       | Midye Dolma       | -                                          |
| 132 | HL132        | 08.05.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 133 | HL133        | 09.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 134 | HL134        | 13.05.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 135 | HL135        | 13.05.2019       | Acılı Ezme        | -                                          |
| 136 | HL136        | 13.05.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 137 | HL137        | 15.05.2019       | İtalyan Salatası  | +                                          |
| 138 | HL138        | 16.05.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 139 | HL139        | 04.11.2019       | Arnavut Ciğeri    | +                                          |
| 140 | HL140        | 04.11.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | +                                          |
| 141 | HL141        | 05.11.2019       | Çiğ Süt           | +                                          |
| 142 | HL142        | 05.11.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 143 | HL143        | 05.11.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 144 | HL144        | 06.11.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 145 | HL145        | 07.11.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 146 | HL146        | 08.11.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 147 | HL147        | 11.11.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 148 | HL148        | 13.11.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 149 | HL149        | 13.11.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 150 | HL150        | 14.11.2019       | Sebze Yıkama Suyu | -                                          |
| 151 | HL151        | 15.11.2019       | Çiğ Süt           | +                                          |
| 152 | HL152        | 18.11.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 153 | HL153        | 21.11.2019       | Rus Salatası      | -                                          |
| 154 | HL154        | 22.11.2019       | Kokoreç           | -                                          |
| 155 | HL155        | 22.11.2019       | Kokoreç           | -                                          |
| 156 | HL156        | 26.11.2019       | Rus Salatası      | +                                          |
| 157 | HL157        | 27.11.2019       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 158 | HL158        | 02.12.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | -                                          |
| 159 | HL159        | 04.12.2019       | Köfte Ekmek       | +                                          |
| 160 | HL160        | 04.12.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |

**Çizelge 5.1. (devam)** Tez çalışması kapsamında *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan örnekler

| No  | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|-----|--------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 161 | HL161        | 10.12.2019       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 162 | HL162        | 11.12.2019       | Şakşuka           | +                                          |
| 163 | HL163        | 11.12.2019       | Mevsim Salatası   | -                                          |
| 164 | HL164        | 12.12.2019       | Şakşuka           | +                                          |
| 165 | HL165        | 12.12.2019       | Sebze Yıkama Suyu | +                                          |
| 166 | HL166        | 16.12.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 167 | HL167        | 18.12.2019       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 168 | HL168        | 18.12.2019       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 169 | HL169        | 19.12.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 170 | HL170        | 19.12.2019       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 171 | HL171        | 24.12.2019       | Mevsim Salatası   | -                                          |
| 172 | HL172        | 24.12.2019       | Meyve Yıkama Suyu | -                                          |
| 173 | HL173        | 06.01.2020       | Rus Salatası      | +                                          |
| 174 | HL174        | 08.01.2020       | Yüzey Swap Örneği | -                                          |
| 175 | HL175        | 09.01.2020       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 176 | HL176        | 23.01.2020       | Çiğ Kırmızı Et    | +                                          |
| 177 | HL177        | 24.01.2020       | Arnavut Ciğeri    | -                                          |
| 178 | HL178        | 04.02.2020       | Çiğ Süt           | -                                          |
| 179 | HL179        | 05.02.2020       | Çiğ Tavuk Eti     | -                                          |
| 180 | HL180        | 05.02.2020       | Rus Salatası      | -                                          |

ALOA ve PALCAM agarda tipik koloni morfolojisi görülen örneklerden izole edilen kültür ortamlarına morfolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır.

## **5.2. LISTERIA SPP. İZOLATLARININ MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI**

ALOA ve PALCAM agar ortamlarından *Listeria* spp. için tipik koloni morfolojisi gösteren toplam 71 örnekten elde olunan izolata Gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve hareketlilik testi uygulanmıştır (Çizelge 5.2.). 71 izolatın tamamının mikroskopta çubuk morfolojisine sahip olduğu görülmüş ve Gram (+) olarak tanımlanmıştır. İzolatların tamamı oksidaz (-) reaksiyon gösterirken, 66 tanesi katalaz (+) özellik ve 5 tanesi ise katalaz (-) özellik göstermiştir. Hareketlilik testinde ise 61 izolat pozitif sonuç gösterirken, 10 izolat ise negatif sonuç göstermiştir. Gram (+), katalaz (+), oksidaz (-) ve hareketlilik



(+) olarak tanımlanan toplam 61 örnekle çalışmaya devam edilmiştir. Hareket (-) ve/veya katalaz (-) olarak tanımlanan HL17, HL37, HL47, HL69, HL94, HL100, HL139, HL141, HL160 ve HL168 nolu izolatlar, çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır. Muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanan 61 izolat, %40 steril gliserol içeren TSYE broth ortamında -20°C’de stoğa alınmıştır.



**Çizelge 5.2.** İzolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

| <b>No</b> | <b>Bakteri Kodu</b> | <b>Gram Boyama</b> | <b>Katalaz Testi</b> | <b>Oksidaz Testi</b> | <b>Hareketlilik Testi</b> |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|
| 1         | HL3                 | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 2         | HL6                 | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 3         | HL8                 | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 4         | HL11                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 5         | HL15                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 6         | HL17                | +                  | -                    | -                    | -                         |
| 7         | HL19                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 8         | HL22                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 9         | HL26                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 10        | HL27                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 11        | HL29                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 12        | HL31                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 13        | HL33                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 14        | HL36                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 15        | HL37                | +                  | -                    | -                    | -                         |
| 16        | HL46                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 17        | HL47                | +                  | -                    | -                    | -                         |
| 18        | HL48                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 19        | HL49                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 20        | HL50                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 21        | HL52                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 22        | HL54                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 23        | HL55                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 24        | HL58                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 25        | HL63                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 26        | HL65                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 27        | HL66                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 28        | HL69                | +                  | +                    | -                    | -                         |
| 29        | HL71                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 30        | HL76                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 31        | HL78                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 32        | HL80                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 33        | HL81                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 34        | HL84                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 35        | HL89                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 36        | HL90                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 37        | HL94                | +                  | -                    | -                    | -                         |
| 38        | HL95                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 39        | HL98                | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 40        | HL100               | +                  | +                    | -                    | -                         |
| 41        | HL105               | +                  | +                    | -                    | +                         |
| 42        | HL111               | +                  | +                    | -                    | +                         |

**Çizelge 5.2. (devam)** İzolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

| No | Bakteri Kodu | Gram Boyama | Katalaz Testi | Oksidaz Testi | Hareketlilik Testi |
|----|--------------|-------------|---------------|---------------|--------------------|
| 43 | HL113        | +           | +             | -             | +                  |
| 44 | HL115        | +           | +             | -             | +                  |
| 45 | HL116        | +           | +             | -             | +                  |
| 46 | HL118        | +           | +             | -             | +                  |
| 47 | HL119        | +           | +             | -             | +                  |
| 48 | HL122        | +           | +             | -             | +                  |
| 49 | HL125        | +           | +             | -             | +                  |
| 50 | HL129        | +           | +             | -             | +                  |
| 51 | HL130        | +           | +             | -             | +                  |
| 52 | HL132        | +           | +             | -             | +                  |
| 53 | HL134        | +           | +             | -             | +                  |
| 54 | HL136        | +           | +             | -             | +                  |
| 55 | HL137        | +           | +             | -             | +                  |
| 56 | HL139        | +           | -             | -             | -                  |
| 57 | HL140        | +           | +             | -             | +                  |
| 58 | HL141        | +           | +             | -             | -                  |
| 59 | HL143        | +           | +             | -             | +                  |
| 60 | HL146        | +           | +             | -             | +                  |
| 61 | HL147        | +           | +             | -             | +                  |
| 62 | HL151        | +           | +             | -             | +                  |
| 63 | HL156        | +           | +             | -             | +                  |
| 64 | HL159        | +           | +             | -             | +                  |
| 65 | HL160        | +           | -             | -             | -                  |
| 66 | HL162        | +           | +             | -             | +                  |
| 67 | HL164        | +           | +             | -             | +                  |
| 68 | HL165        | +           | +             | -             | +                  |
| 69 | HL168        | +           | +             | -             | -                  |
| 70 | HL173        | +           | +             | -             | +                  |
| 71 | HL176        | +           | +             | -             | +                  |

Muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının 35'i (HL3, HL6, HL11, HL15, HL19, HL22, HL27, HL33, HL36, HL46, HL49, HL52, HL54, HL63, HL65, HL71, HL80, HL81, HL89, HL90, HL113, HL116, HL119, HL122, HL125, HL129, HL132, HL134, HL137, HL143, HL156, HL159, HL162, HL164, HL173) tüketime hazır gıdalardan, 10'u (HL8, HL26, HL50, HL55, HL98, HL115, HL118, HL136, HL146, HL165) meyve ve sebze yıkama suyundan, 7'si (HL29, HL48, HL58, HL66, HL78, HL147, HL176) çiğ kırmızı etten, 4'ü (HL76, HL84, HL95, HL140) çiğ tavuk etinden, 3'ü (HL105, HL111, HL151) çiğ sütten ve 2'si (HL31, HL130) ise yüzey swap örneğinden izole edilmiştir.

### 5.3. *LISTERIA* SPP. İZOLATLARININ 16S RNA DİZİ ANALİZİ İLE MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

Morfolojik ve biyokimyasal olarak muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanan 61 izolata, 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. PZR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin çift yönlü DNA dizi analizi sonuçları, BLAST programı kullanılarak NCBI veri tabanında bulunan 16S rRNA dizileriyle benzerlik oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.3).



**Çizelge 5.3.** *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlaması

| No | Bakteri Kodu | İleri (F)               | Benzerlik oranı (%) | Geri (R)                | Benzerlik oranı (%) | 16S rRNA Dizisine Göre Yapılan Tanı |
|----|--------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 1  | HL3          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 2  | HL6          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 3  | HL8          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 4  | HL11         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 100                 | <i>L. innocua</i>                   |
| 5  | HL15         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 6  | HL19         | <i>L. monocytogenes</i> | 97                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 7  | HL22         | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 8  | HL26         | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>                |
| 9  | HL27         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 10 | HL29         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 11 | HL31         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 12 | HL33         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 13 | HL36         | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 14 | HL46         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 15 | HL48         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 16 | HL49         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 17 | HL50         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 98                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 18 | HL52         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 19 | HL54         | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 20 | HL55         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 21 | HL58         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 22 | HL63         | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 23 | HL65         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 24 | HL66         | <i>L. innocua</i>       | 98                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |

**Çizelge 5.3.(devam)** *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlaması

| No | Bakteri Kodu | İleri (F)               | Benzerlik oranı (%) | Geri (R)                | Benzerlik oranı (%) | 16S rRNA Dizisine Göre Yapılan Tanı |
|----|--------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 25 | HL71         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 26 | HL76         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 27 | HL78         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 28 | HL80         | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 29 | HL81         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 30 | HL84         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 31 | HL89         | <i>L. innocua</i>       | 97                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 32 | HL90         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 33 | HL95         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 34 | HL98         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 35 | HL105        | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 36 | HL111        | <i>L. grayii</i>        | 97                  | <i>L. grayii</i>        | 98                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 37 | HL113        | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 38 | HL115        | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 39 | HL116        | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 100                 | <i>L. grayii</i>                    |
| 40 | HL118        | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 41 | HL119        | <i>L. innocua</i>       | 97                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 42 | HL122        | <i>L. welshimeri</i>    | 98                  | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>                |
| 43 | HL125        | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 44 | HL129        | <i>L. welshimeri</i>    | 98                  | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>                |
| 45 | HL130        | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 46 | HL132        | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 47 | HL134        | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 48 | HL136        | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |

**Çizelge 5.3.(devam)** *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlaması

| No | Bakteri Kodu | İleri (F)               | Benzerlik oranı (%) | Geri (R)                | Benzerlik oranı (%) | 16S rRNA Dizisine Göre Yapılan Tanı |
|----|--------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 49 | HL137        | <i>L. innocua</i>       | 98                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 50 | HL140        | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>    | 99                  | <i>L. welshimeri</i>                |
| 51 | HL143        | <i>L. innocua</i>       | 97                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 52 | HL146        | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 98                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 53 | HL147        | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 54 | HL151        | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 55 | HL156        | <i>L. innocua</i>       | 98                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| 56 | HL159        | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 57 | HL162        | <i>L. welshimeri</i>    | 98                  | <i>L. welshimeri</i>    | 98                  | <i>L. welshimeri</i>                |
| 58 | HL164        | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 59 | HL165        | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 98                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| 60 | HL173        | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>        | 99                  | <i>L. grayii</i>                    |
| 61 | HL176        | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |

16S rRNA dizi analizi sonucunda 61 adet *Listeria* spp. suşunun;

- 29 tanesi *L. monocytogenes* (HL3, HL8, HL15, HL19, HL22, HL27, HL29, HL31, HL33, HL46, HL48, HL49, HL52, HL55, HL58, HL65, HL71, HL76, HL80, HL84, HL98, HL105, HL118, HL130, HL136, HL147, HL159, HL164, HL165),
- 9 tanesi *L. grayii* (HL36, HL54, HL63, HL111, HL116, HL132, HL146, HL151, HL173),
- 5 tanesi *L. welshimeri* (HL26, HL122, HL129, HL140, HL162),
- 18 tanesi ise *L. innocua* (HL6, HL11, HL50, HL66, HL78, HL81, HL89, HL90, HL95, HL113, HL115, HL119, HL125, HL134, HL137, HL143, HL156, HL176) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 5.3).

Tüketime hazır gıdalardan izole edilen 35 *Listeria* spp. suşunun 14'ü *L. monocytogenes* (HL3, HL15, HL19, HL22, HL27, HL33, HL46, HL49, HL52, HL65, HL71, HL80, HL159, HL164), 12'si *L. innocua* (HL6, HL11, HL81, HL89, HL90, HL113, HL119, HL125, HL134, HL137, HL143, HL156), 6'sı *L. grayii* (HL36, HL54, HL63, HL116, HL132, HL173) ve 3'ü ise *L. welshimeri* (HL122, HL129, HL162) olarak tanımlanmıştır.

Meyve ve sebze yıkama sularından izole edilen 10 *Listeria* spp. suşunun 6'sı *L. monocytogenes* (HL8, HL55, HL98, HL118, HL136, HL165), 2'si *L. innocua* (HL50, HL115), 1'i *L. grayii* (HL146) ve 1'i ise *L. welshimeri* (HL26) olarak tanımlanmıştır.

Çiğ kırmızı etten izole edilen 7 *Listeria* spp. suşunun 4'ü *L. monocytogenes* (HL29, HL48, HL58, HL147) ve 3'ü ise *L. innocua* (HL66, HL78, HL176) olarak tanımlanmıştır.

Çiğ tavuk etinden izole edilen 4 *Listeria* spp. suşunun 2'si *L. monocytogenes* (HL76, HL84), 1'i *L. innocua* (HL95) ve 1'i ise *L. welshimeri* (HL140) olarak tanımlanmıştır.

Çiğ süttten izole edilen 3 *Listeria* spp. suşunun 2'si *L. grayii* (HL111, HL151) ve 1'i ise *L. monocytogenes* (HL105) olarak tanımlanmıştır.

Yüzey swap örneklerinden izole edilen 2 *Listeria* spp. suşunun 2'si de *L. monocytogenes* (HL31, HL130) olarak tanımlanmıştır.

#### **5.4. LISTERIA MONOCYTOGENES SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

Moleküler düzeyde *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 29 adet suşta; *hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA* ve *flaA* olmak üzere toplam 7 adet virülens gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır. Çizelge 5.4.'te *L. monocytogenes* suşlarının virülens gen bölgeleri bakımından yapılan tarama sonucu özetlenmiştir. Benzer şekilde Şekil 5.3., Şekil 5.4., Şekil 5.5., Şekil 5.6., Şekil 5.7., Şekil 5.8. ve Şekil 5.9. 'da ise *L. monocytogenes* suşlarının virülens gen bölgelerinin agaroz jel görüntüleri verilmiştir.

Tez çalışmasında kontrol suşu olarak kullanılan *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda *actA*, *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *prfA* gen bölgeleri varlığı tanımlanırken, *inlA* ve *flaA* gen bölgeleri saptanamamıştır.

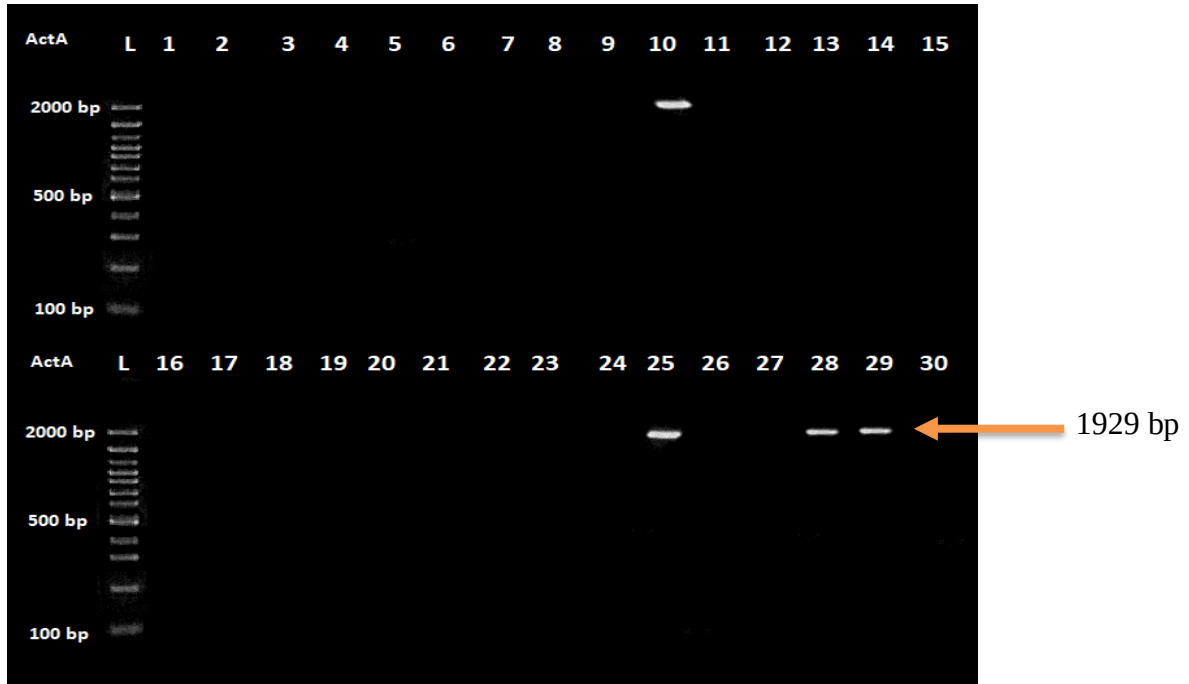


29 *L. monocytogenes* suşundan;

- Üçünde (HL19, HL130, HL164) *actA* gen bölgesi,
- Yedisinde (HL27, HL29, HL58, HL84, HL130, HL147, HL159) *fbp* gen bölgesi,
- Yirmisinde (HL8, HL15, HL22, HL27, HL29, HL33, HL48, HL49, HL55, HL58, HL65, HL71, HL76, HL80, HL98, HL105, HL118, HL130, HL136, HL159) *iap* gen bölgesi,
- Ondördünde (HL19, HL22, HL27, HL33, HL46, HL52, HL58, HL80, HL84, HL118, HL130, HL147, HL159, HL164) *hlyA* gen bölgesi,
- Yirmibirinde (HL3, HL8, HL15, HL19, HL29, HL31, HL33, HL46, HL52, HL55, HL58, HL65, HL80, HL84, HL98, HL105, HL130, HL136, HL147, HL164, HL165) *prfA* gen bölgesi,
- Onunda (HL15, HL19, HL22, HL46, HL49, HL65, HL105, HL130, HL159, HL165) *inlA* gen bölgesi varlığı tanımlanmıştır.
- Suşların hiçbirinde *flaA* gen bölgesi varlığı tanımlanmamıştır.

**Çizelge 5.4.** *Listeria monocytogenes* suşlarında gen bölgelerinin varlığının araştırılması

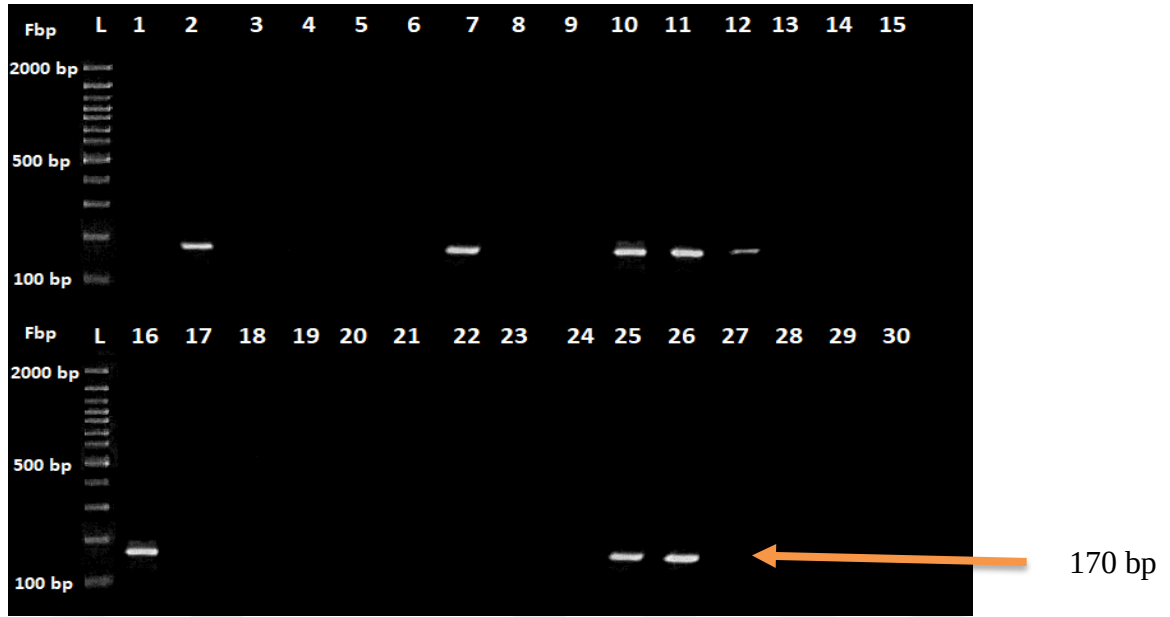
| No | Bakteri kodu | <i>actA</i> | <i>fbp</i> | <i>iap</i> | <i>hlyA</i> | <i>fla</i> | <i>prfA</i> | <i>inlA</i> |
|----|--------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 1  | HL3          | -           | -          | -          | -           | -          | +           | -           |
| 2  | HL8          | -           | -          | +          | -           | -          | +           | -           |
| 3  | HL15         | -           | -          | +          | -           | -          | +           | +           |
| 4  | HL19         | +           | -          | -          | +           | -          | +           | +           |
| 5  | HL22         | -           | -          | +          | +           | -          | -           | +           |
| 6  | HL27         | -           | +          | +          | +           | -          | -           | -           |
| 7  | HL29         | -           | +          | +          | -           | -          | +           | -           |
| 8  | HL31         | -           | -          | -          | -           | -          | +           | -           |
| 9  | HL33         | -           | -          | +          | +           | -          | +           | -           |
| 10 | HL46         | -           | -          | -          | +           | -          | +           | +           |
| 11 | HL48         | -           | -          | +          | -           | -          | -           | -           |
| 12 | HL49         | -           | -          | +          | -           | -          | -           | +           |
| 13 | HL52         | -           | -          | -          | +           | -          | +           | -           |
| 14 | HL55         | -           | -          | +          | -           | -          | +           | -           |
| 15 | HL58         | -           | +          | +          | +           | -          | +           | -           |
| 16 | HL65         | -           | -          | +          | -           | -          | +           | +           |
| 17 | HL71         | -           | -          | +          | -           | -          | -           | -           |
| 18 | HL76         | -           | -          | +          | -           | -          | -           | -           |
| 19 | HL80         | -           | -          | +          | +           | -          | +           | -           |
| 20 | HL84         | -           | +          | -          | +           | -          | +           | -           |
| 21 | ATCC 7644    | +           | +          | +          | +           | -          | +           | -           |
| 22 | HL98         | -           | -          | +          | -           | -          | +           | -           |
| 23 | HL105        | -           | -          | +          | -           | -          | +           | +           |
| 24 | HL118        | -           | -          | +          | +           | -          | -           | -           |
| 25 | HL130        | +           | +          | +          | +           | -          | +           | +           |
| 26 | HL136        | -           | -          | +          | -           | -          | +           | -           |
| 27 | HL147        | -           | +          | -          | +           | -          | +           | -           |
| 28 | HL159        | -           | +          | +          | +           | -          | -           | +           |
| 29 | HL164        | +           | -          | -          | +           | -          | +           | -           |
| 30 | HL165        | -           | -          | -          | -           | -          | +           | +           |



Şekil 5.3. *Listeria monocytogenes* suşlarında *actA* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

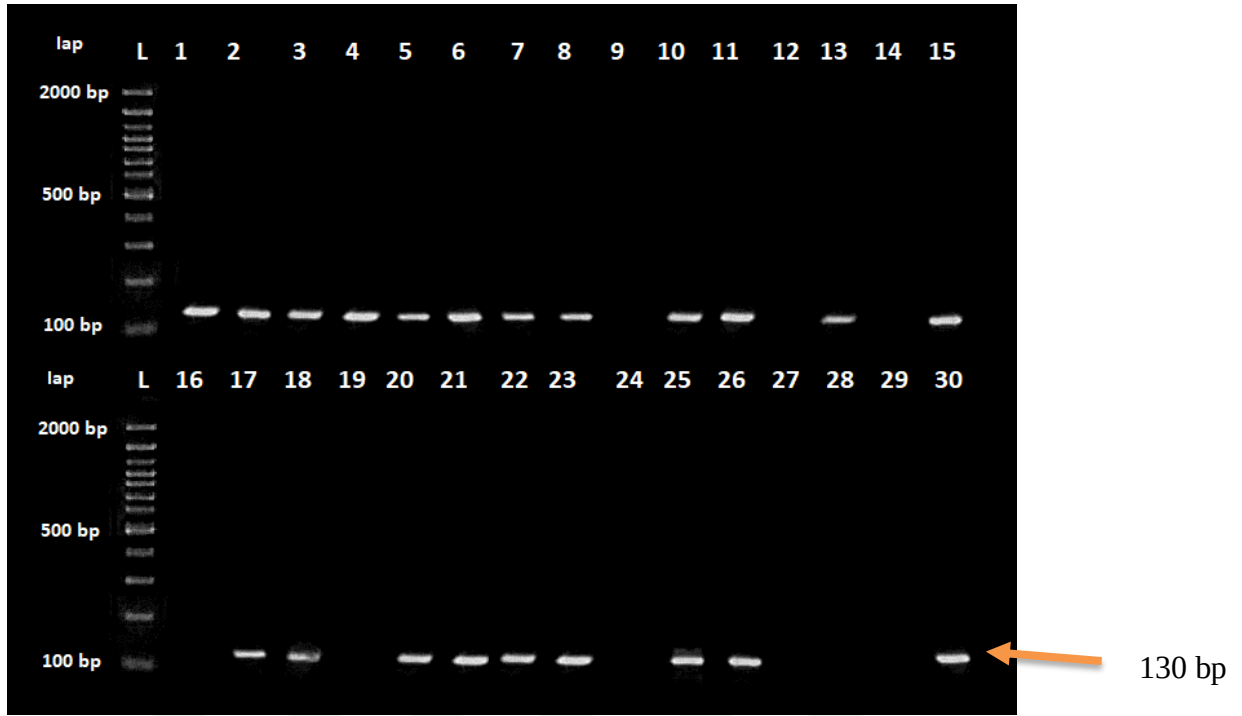
|          |          |          |           |               |
|----------|----------|----------|-----------|---------------|
| 1: HL118 | 7: HL147 | 13: HL52 | 19: HL80  | 25: ATCC 7644 |
| 2: HL8   | 8: HL33  | 14: HL55 | 20: HL84  | 26: HL31      |
| 3: HL76  | 9: HL46  | 15: HL58 | 21: HL29  | 27: HL159     |
| 4: HL22  | 10: HL19 | 16: HL65 | 22: HL105 | 28: HL130     |
| 5: HL27  | 11: HL48 | 17: HL71 | 23: HL3   | 29: HL164     |
| 6: HL98  | 12: HL49 | 18: HL15 | 24: HL136 | 30: HL165     |



**Şekil 5.4.** *Listeria monocytogenes* suşlarında *fbp* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

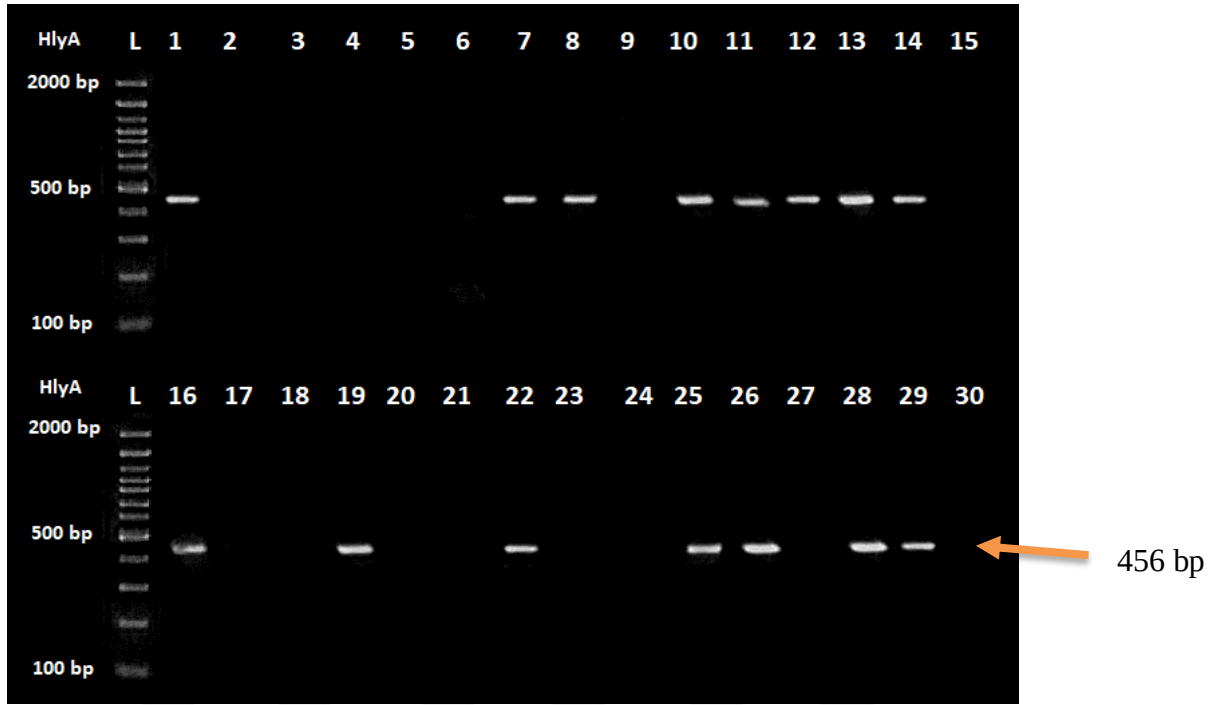
|         |               |           |           |           |
|---------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| 1: HL3  | 7: HL29       | 13: HL46  | 19: HL65  | 25: HL147 |
| 2: HL27 | 8: HL31       | 14: HL48  | 20: HL71  | 26: HL159 |
| 3: HL8  | 9: HL33       | 15: HL49  | 21: HL76  | 27: HL118 |
| 4: HL15 | 10: HL58      | 16: HL130 | 22: HL80  | 28: HL136 |
| 5: HL19 | 11: HL84      | 17: HL52  | 23: HL98  | 29: HL164 |
| 6: HL22 | 12: ATCC 7644 | 18: HL55  | 24: HL105 | 30: HL165 |



Şekil 5.5. *Listeria monocytogenes* suşlarında *iap* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

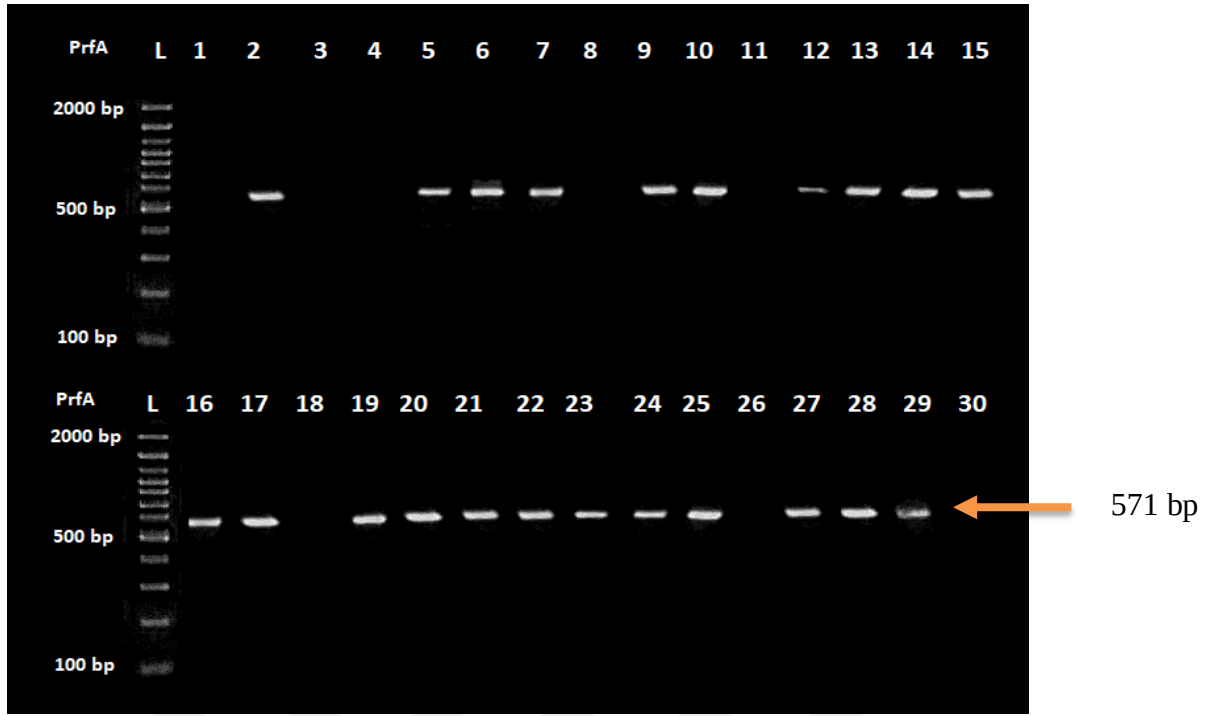
|         |          |          |               |           |
|---------|----------|----------|---------------|-----------|
| 1: HL8  | 7: HL48  | 13: HL65 | 19: HL52      | 25: HL130 |
| 2: HL15 | 8: HL49  | 14: HL31 | 20: ATCC 7644 | 26: HL136 |
| 3: HL22 | 9: HL3   | 15: HL71 | 21: HL98      | 27: HL164 |
| 4: HL27 | 10: HL55 | 16: HL46 | 22: HL105     | 28: HL147 |
| 5: HL29 | 11: HL58 | 17: HL76 | 23: HL118     | 29: HL165 |
| 6: HL33 | 12: HL19 | 18: HL80 | 24: HL84      | 30: HL159 |



Şekil 5.6. *Listeria monocytogenes* suşlarında *hlyA* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

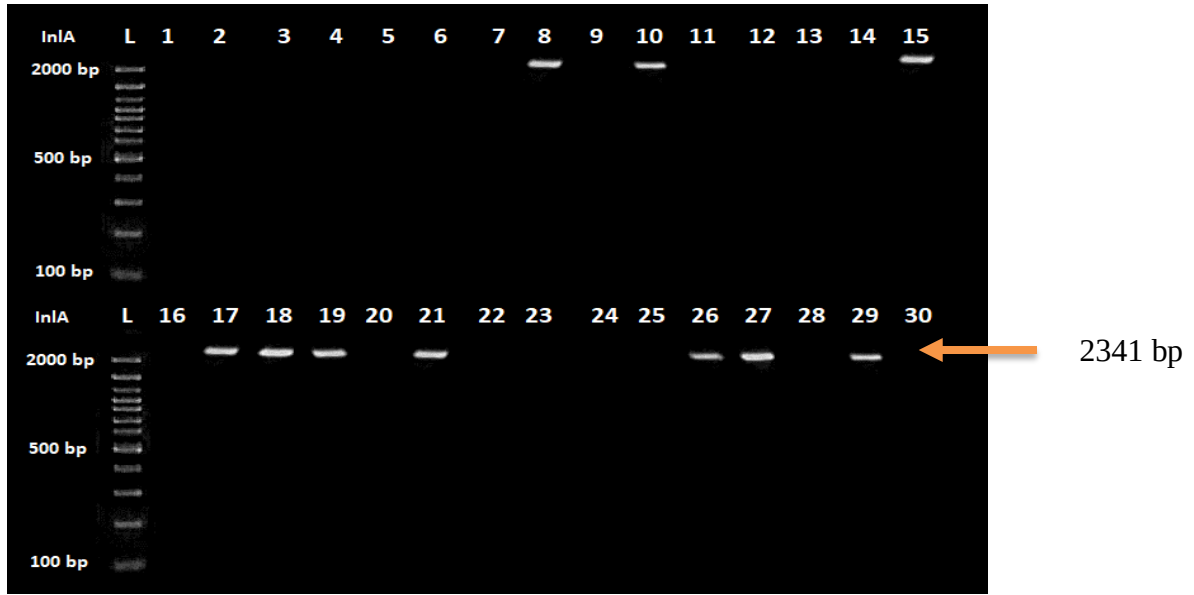
|         |          |          |               |           |
|---------|----------|----------|---------------|-----------|
| 1: HL19 | 7: HL22  | 13: HL58 | 19: ATCC 7644 | 25: HL130 |
| 2: HL3  | 8: HL27  | 14: HL80 | 20: HL71      | 26: HL147 |
| 3: HL8  | 9: HL48  | 15: HL49 | 21: HL76      | 27: HL136 |
| 4: HL15 | 10: HL33 | 16: HL84 | 22: HL118     | 28: HL159 |
| 5: HL29 | 11: HL46 | 17: HL55 | 23: HL98      | 29: HL164 |
| 6: HL31 | 12: HL52 | 18: HL65 | 24: HL105     | 30: HL165 |



Şekil 5.7. *Listeria monocytogenes* suşlarında *prfA* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

|         |          |          |               |           |
|---------|----------|----------|---------------|-----------|
| 1: HL22 | 7: HL19  | 13: HL46 | 19: HL80      | 25: HL136 |
| 2: HL3  | 8: HL49  | 14: HL52 | 20: HL84      | 26: HL118 |
| 3: HL27 | 9: HL29  | 15: HL55 | 21: ATCC 7644 | 27: HL147 |
| 4: HL48 | 10: HL31 | 16: HL58 | 22: HL98      | 28: HL164 |
| 5: HL8  | 11: HL71 | 17: HL65 | 23: HL105     | 29: HL165 |
| 6: HL15 | 12: HL33 | 18: HL76 | 24: HL130     | 30: HL159 |

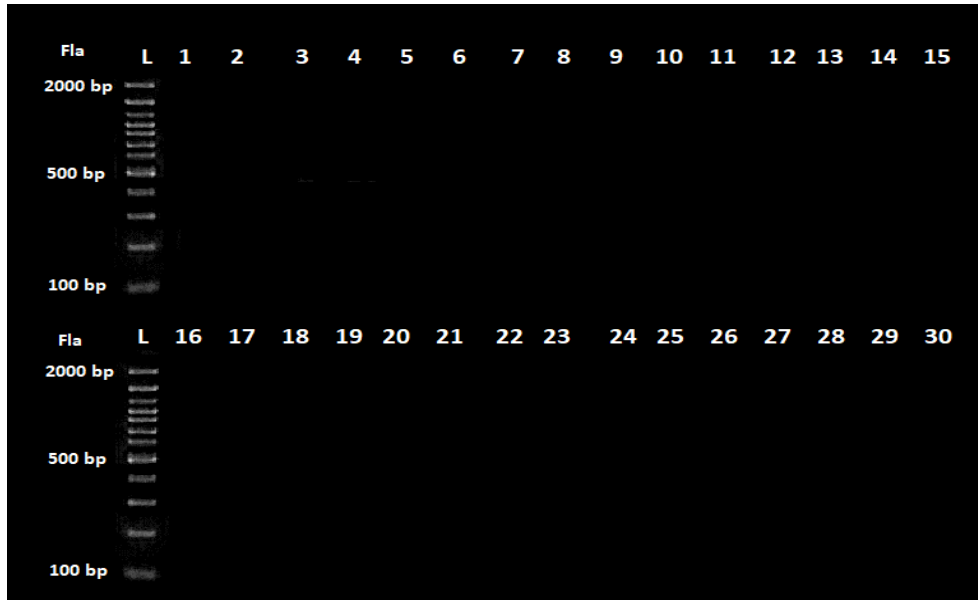


**Şekil 5.8.** *Listeria monocytogenes* suşlarında *inA* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

|         |          |          |               |           |
|---------|----------|----------|---------------|-----------|
| 1: HL3  | 7: HL48  | 13: HL71 | 19: HL65      | 25: HL136 |
| 2: HL8  | 8: HL15  | 14: HL76 | 20: HL84      | 26: HL130 |
| 3: HL27 | 9: HL52  | 15: HL22 | 21: HL105     | 27: HL159 |
| 4: HL29 | 10: HL19 | 16: HL80 | 22: ATCC 7644 | 28: HL147 |
| 5: HL31 | 11: HL55 | 17: HL46 | 23: HL98      | 29: HL159 |
| 6: HL33 | 12: HL58 | 18: HL49 | 24: HL118     | 30: HL165 |





**Şekil 5.9.** *Listeria monocytogenes* suşlarında *fla* geninine ait bantların jel elektroforez görüntüsü

L: DNA marker

|         |          |          |               |           |
|---------|----------|----------|---------------|-----------|
| 1: HL3  | 7: HL19  | 13: HL46 | 19: HL80      | 25: HL136 |
| 2: HL8  | 8: HL29  | 14: HL48 | 20: HL84      | 26: HL130 |
| 3: HL22 | 9: HL52  | 15: HL49 | 21: HL98      | 27: HL147 |
| 4: HL29 | 10: HL31 | 16: HL65 | 22: ATCC 7644 | 28: HL159 |
| 5: HL27 | 11: HL33 | 17: HL71 | 23: HL105     | 29: HL164 |
| 6: HL15 | 12: HL58 | 18: HL76 | 24: HL118     | 30: HL165 |

Tez çalışmasında araştırılan toplam yedi adet virülens gen bölgesinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA* ve *flaA*) hepsini genomunda içeren *L. monocytogenes* suşu saptanamamıştır. *L. monocytogenes* suşlarından 5 tanesi (HL3, HL31, HL48, HL71, HL76) bir adet virülens gen bölgesi, 8 tanesi (HL8, HL49, HL52, HL55, HL98, HL118, HL136, HL165) iki adet virülens gen bölgesi, 12 tanesi (HL15, HL22, HL27, HL29, HL33, HL46, HL65, HL80, HL84, HL105, HL147, HL164) üç adet virülens gen bölgesi, 3 tanesi (HL19, HL58, HL159) dört adet virülens gen bölgesi ve 1 tanesi (HL130) ise altı adet virülens gen bölgesi içermektedir.

### **5.5. *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİ**

Tez çalışmasında 29 adet *L. monocytogenes* suşu ile *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşunun 24 h, 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürelerinin sonunda biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmıştır. Biyofilm oluşturma durumlarına göre suşlar güçlü, orta ve zayıf üretici olarak tanımlanmıştır. Çizelge 5.5.'de zayıf biyofilm üreticisi (+) olarak, orta derecede biyofilm üreticisi (++) olarak ve güçlü biyofilm üreticisi (+++) olarak sembolize edilmiştir.

**Çizelge 5.5.** *Listeria monocytogenes* suşlarının 24 h, 48 h ve 72 h’lik inkübasyon sonunda biyofilm üretim kapasiteleri

| Şuş No    | 24 h’lik inkübasyon sonunda | 48 h’lik inkübasyon sonunda | 72 h’lik inkübasyon sonunda |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| HL3       | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL8       | +                           | +++                         | +++                         |
| HL15      | ++                          | ++                          | +++                         |
| HL19      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL22      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL27      | +                           | ++                          | ++                          |
| HL29      | ++                          | +++                         | +++                         |
| HL31      | +++                         | +++                         | +++                         |
| HL33      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL46      | ++                          | +++                         | +++                         |
| HL48      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL49      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL52      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL55      | ++                          | ++                          | +++                         |
| HL58      | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL65      | ++                          | +++                         | +++                         |
| HL71      | ++                          | +++                         | +++                         |
| HL76      | +++                         | +++                         | +++                         |
| HL80      | ++                          | +++                         | +++                         |
| HL84      | ++                          | ++                          | ++                          |
| ATCC 7644 | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL98      | +++                         | +++                         | +++                         |
| HL106     | +++                         | +++                         | ++                          |
| HL118     | ++                          | ++                          | ++                          |
| HL130     | +                           | ++                          | ++                          |
| HL136     | +                           | ++                          | ++                          |
| HL147     | ++                          | +++                         | ++                          |
| HL159     | ++                          | ++                          | +                           |
| HL164     | +                           | ++                          | ++                          |
| HL165     | +                           | ++                          | ++                          |

24 h'lik inkübasyon sonunda;

- HL8, HL27, HL55, HL130, HL136, HL164 ve HL165 suşları zayıf üretici;
- HL3, HL15, HL19, HL22, HL29, HL33, HL46, HL48, HL49, HL52, HL58, HL65, HL71, HL80, HL84, HL118, HL147 ve HL159 suşları orta derecede üretici;
- HL31, HL76, HL98 ve HL106 suşları ise güçlü üretici suşlar olarak tanımlanmıştır.

48 h'lik inkübasyon sonunda;

- HL3, HL15, HL19, HL22, HL27, HL33, HL48, HL49, HL52, HL55, HL58, HL84, HL118, HL130, HL136, HL159, HL164 ve HL165 suşları orta derecede üretici;
- HL8, HL29, HL31, HL46, HL65, HL71, HL76, HL80, HL98, HL106 ve HL147 suşları ise güçlü üretici suşlar olarak tanımlanmıştır.

72 h'lik inkübasyon sonunda;

- HL159 suşu zayıf üretici;
- HL3, HL19, HL22, HL27, HL33, HL48, HL49, HL52, HL58, HL84, HL106, HL118, HL130, HL136, HL147, HL164 ve HL165 suşları orta derecede üretici;
- HL8, HL15, HL29, HL31, HL46, HL55, HL65, HL71, HL76, HL80 ve HL98 suşları ise güçlü üretici suşlar olarak tanımlanmıştır.

HL31, HL76 ve HL98 suşları her üç inkübasyon süresi sonunda da güçlü üretici suş olarak tanımlanmıştır. HL3, HL19, HL22, HL33, HL48, HL49, HL52, HL58, HL84, ATCC7644 ve HL118 suşları ise, her üç inkübasyon süresi sonunda da orta derecede biyofilm üreticisi suş olarak tanımlanmıştır.

## **5.6. PERASETİK ASİT İLE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARDAKİ BİYOFİLM ÜRETİCİSİ *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmasının bundan sonraki aşamasında, güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanan HL31, HL76 ve HL98 suşları ile *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşu kullanılarak devam edilmiştir.

Gıda işletmelerinde geniş ölçüde kullanımı tercih edilen 316L kalite paslanmaz çelik yüzeylerde, *L. monocytogenes* suşlarının 48 h ve 72 h'lik inkübasyon süreleri boyunca

biyofilm oluşturması sağlanmıştır. elik kuponlar üzerinde biyofilm üreticisi suş sayısını belirlemek amacıyla canlı hücre sayımı yapılmış ve izelge 5.6.'da elde olunan sonuçlar gösterilmiştir. HL31 suşunda her iki sıcaklık derecesinde de diğer iki suşa (HL76 ve HL98) kıyasla daha yüksek oranda canlı hücre sayımı yapılmıştır. ATCC7644 kontrol suşunda ise 48 h'lik inkübasyon sonucunda canlı hücre sayımı, 72 h'e kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 5.6.** elik kuponlar üzerinde 48 h ve 72 h sonunda oluşan biyofilm üreticisi suş sayıları

| Suş             | 48 h              |                    |                    | 72 h               |                   |                   |
|-----------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|                 | 1. tekrar         | 2. tekrar          | 3. tekrar          | 1. tekrar          | 2. tekrar         | 3. tekrar         |
|                 | KOB/mL            |                    |                    | KOB/mL             |                   |                   |
| <b>HL31</b>     | $1,1 \times 10^5$ | $9,6 \times 10^4$  | $1,03 \times 10^5$ | $1,86 \times 10^5$ | $2,2 \times 10^5$ | $2 \times 10^5$   |
| <b>HL76</b>     | $1,6 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^4$  | $1,4 \times 10^4$  | $2,2 \times 10^5$  | $2,1 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^4$ |
| <b>HL98</b>     | $5,9 \times 10^4$ | $6,3 \times 10^4$  | $5,5 \times 10^4$  | $7,1 \times 10^4$  | $7,3 \times 10^4$ | $6,6 \times 10^4$ |
| <b>ATCC7644</b> | $1,1 \times 10^5$ | $1,16 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^5$  | $4,8 \times 10^4$  | $4,4 \times 10^4$ | $4,3 \times 10^4$ |

Gıda sanayinde dezenfeksiyon amacıyla yaygın olarak kullanılan PAA ve QAC'nin elik kuponlarda oluşan biyofilm yapısı üzerindeki etkinlik düzeyleri farklı konsantrasyonlarda (%0,1, %0,2 ve %0,3), farklı sürelerde (90 ve 120 saniye) ve farklı sıcaklık derecelerinde (25°C ve 37°C) test edilmiştir.

- *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC uygulaması sonucunda elde olunan koloni sayıları (KOB/mL) izelge 5.7., izelge 5.8., izelge 5.9. ve izelge 5.10.'da,
- PAA ve QAC uygulamasından sonra cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı izelge 5.11., izelge 5.12., izelge 5.13. ve izelge 5.14.'de,
- *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC uygulamasından sonra pozitif kontrollere göre canlı hücre sayısındaki azalma değerleri ise izelge 5.15. ve izelge 5.16.,
- Çizelge 5.17., izelge 5.18., izelge 5.19., izelge 5.20., izelge 5.21., izelge 5.22., izelge 5.23., izelge 5.24., izelge 5.25., izelge 5.26. ve izelge 5.27.'de yapılan

istatistiki çalışmalar yer almaktadır. İstatistiksel analizler ilgili tablolar üzerinde gösterilmemiş olup, bu analizlerin ayrı tablolar halinde belirtilmesi tercih edilmiştir.

Çizelgelerde 48 ve 72 h'lik inkübasyon sürelerinin sonunda pozitif kontrol değerleri verilmiştir. Denemede negatif kontrol ortamlarında koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Her deney seti  paralelli olacak şekilde planlanmış ve sonuçlar tablolarda ayrı ayrı sunulmuştur.



**Çizelge 5.7.** HL76 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL)

| Dezenfektanların uygulanma parametreleri |      |       | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          |          |                   |
|------------------------------------------|------|-------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------|
|                                          |      |       | PAA                                                 |          |          | QAC      |          |          | Poizitif Kontrol                                    | PAA      |          |          | QAC      |          |          | Poizitif Kontrol  |
|                                          |      |       | 1.tekrar                                            | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                                                     | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                   |
| 25°C                                     | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 6,1×10 <sup>4</sup>                                 | 14       | 16       | 17       | 670      | 667      | 665      | 7×10 <sup>4</sup> |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 3        | 4        | 4        |                                                     | 3        | 2        | 3        | 366      | 348      | 379      |                   |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 36       | 32       | 39       |                   |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 4        | 3        | 4        |                   |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                   |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                   |
| 37°C                                     | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 159      | 144      | 168      |                   |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 2        | 3        | 2        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 83       | 72       | 76       |                   |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 6                                                   | 6        | 8        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 2        | 1        | 1        |                   |
|                                          |      | 120 s | 2                                                   | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                   |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                   |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                   |

**Çizelge 5.8.** HL98 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL)

| Dezenfektanların uygulanma parametreleri |      |       | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          |                     | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          |                      |
|------------------------------------------|------|-------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|
|                                          |      |       | PAA                                                 |          |          | QAC      |          |          | Pozitif Kontrol     | PAA                                                 |          |          | QAC      |          |          | Pozitif Kontrol      |
|                                          |      |       | 1.tekrar                                            | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                     | 1.tekrar                                            | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                      |
| 25°C                                     | %0,1 | 90 s  | 98                                                  | 92       | 87       | 245      | 236      | 252      | 1,5×10 <sup>4</sup> | 11                                                  | 9        | 10       | 186      | 179      | 190      | 1,83×10 <sup>4</sup> |
|                                          |      | 120 s | 32                                                  | 36       | 33       | 295      | 190      | 302      |                     | 182                                                 | 176      | 189      | 66       | 69       | 71       |                      |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 164      | 149      | 151      |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 876      | 750      | 764      |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 126      | 133      | 130      |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 720      | 693      | 702      |                      |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
| 37°C                                     | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 18       | 16       | 15       |                     | 1                                                   | 1        | 1        | 86       | 88       | 89       |                      |
|                                          |      | 120 s | 18                                                  | 16       | 20       | 12       | 11       | 15       |                     | 3                                                   | 2        | 2        | 146      | 162      | 150      |                      |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 15                                                  | 16       | 18       | 2        | 3        | 3        |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 153      | 161      | 159      |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 46       | 51       | 43       |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 124      | 133      | 140      |                      |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 6        | 4        | 4        |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 15       | 14       | 12       |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                     | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 18       | 16       | 15       |                     | 1                                                   | 1        | 1        | 86       | 88       | 89       |                      |
|                                          |      | 120 s | 18                                                  | 16       | 20       | 12       | 11       | 15       |                     | 3                                                   | 2        | 2        | 146      | 162      | 150      |                      |



**Çizelge 5.9.** HL31 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL)

| Dezenfektanların uygulanma parametreleri |      |       | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |          |          |          |          |          |          |                      |
|------------------------------------------|------|-------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|
|                                          |      |       | PAA                                                 |          |          | QAC      |          |          | Poizitif Kontrol                                    | PAA      |          |          | QAC      |          |          | Pozitif Kontrol      |
|                                          |      |       | 1.tekrar                                            | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                                                     | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar | 1.tekrar | 2.tekrar | 3.tekrar |                      |
| 25°C                                     | %0,1 | 90 s  | 1                                                   | 1        | 2        | 61       | 56       | 60       | 1,11×10 <sup>5</sup>                                | 6        | 4        | 3        | 5        | 3        | 2        | 2,03×10 <sup>5</sup> |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 1        | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 31       | 26       | 28       |                                                     | 0        | 0        | 0        | 16       | 10       | 14       |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
| 37°C                                     | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |
|                                          |      | 120 s | 0                                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                                                     | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |                      |

**Çizelge 5.10.** *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonucundaki koloni sayıları (KOB/mL)

[illegible]

**Çizelge 5.11.** HL76 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri

|       | DOZ  | SÜRE  | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         |
|-------|------|-------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
|       |      |       | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         |
|       |      |       | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> |
| 25 °C | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 168                                                 | 2,26                    | 7,16×10 <sup>3</sup>                      | 3,855                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 39,3                                      | 1,595                   | 28,6                                                | 1,457                   | 3,91×10 <sup>3</sup>                      | 3,592                   |
|       | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 383                                       | 2,583                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 39,3                                      | 1,595                   |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
| 37°C  | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 1,68×10 <sup>3</sup>                      | 3,226                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 25                                        | 1,399                   | 0                                                   | 0                       | 826                                       | 2,917                   |
|       | %0,2 | 90 s  | 71,5                                                | 1,854                   | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 14,3                                      | 1,156                   |
|       |      | 120 s | 14,3                                                | 1,156                   | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |

**Çizelge 5.12.** HL98 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri

|       | DOZ  | SÜRE  | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         |
|-------|------|-------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
|       |      |       | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         |
|       |      |       | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> |
| 25 °C | %0,1 | 90 s  | 991                                                 | 2,996                   | 2,62×10 <sup>3</sup>                      | 3,419                   | 107                                                 | 2,031                   | 1,98×10 <sup>3</sup>                      | 3,298                   |
|       |      | 120 s | 361                                                 | 2,558                   | 2,81×10 <sup>3</sup>                      | 3,449                   | 1,96×10 <sup>3</sup>                                | 3.291                   | 737                                       | 2,867                   |
|       | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 1,66×10 <sup>3</sup>                      | 3,220                   | 0                                                   | 0                       | 8,55×10 <sup>3</sup>                      | 2,932                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 1,39×10 <sup>3</sup>                      | 3,143                   | 0                                                   | 0                       | 7,56×10 <sup>3</sup>                      | 2,879                   |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
| 37°C  | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 175                                       | 2,244                   | 107                                                 | 1,031                   | 941                                       | 2,973                   |
|       |      | 120 s | 193                                                 | 2,286                   | 136                                       | 2,133                   | 25                                                  | 1,399                   | 1,64 ×10 <sup>3</sup>                     | 3,214                   |
|       | %0,2 | 90 s  | 175                                                 | 2,244                   | 28,6                                      | 1,457                   | 0                                                   | 0                       | 1,69 ×10 <sup>3</sup>                     | 3.228                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 501                                       | 2,700                   | 0                                                   | 0                       | 1,42 ×10 <sup>3</sup>                     | 3,152                   |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 50                                        | 1,700                   | 0                                                   | 0                       | 147                                       | 2,166                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |

**Çizelge 5.13.** HL31 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri

|       | DOZ  | SÜRE  | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         |
|-------|------|-------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
|       |      |       | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         |
|       |      |       | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> |
| 25 °C | %0,1 | 90 s  | 14                                                  | 1,156                   | 63                                        | 2,801                   | 46                                                  | 1,667                   | 35                                        | 1,553                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 107                                                 | 1,031                   | 0                                         | 0                       |
|       | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 304                                       | 2,483                   | 0                                                   | 0                       | 143                                       | 2,156                   |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 107                                       | 1,031                   | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
| 37°C  | %0,1 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|       |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |

**Çizelge 5.14.** *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunda dezenfektan uygulamasından sonra cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre sayısı ve logaritmik değerleri

|      | DOZ  | SÜRE  | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm üzerinde |                         |                                           |                         |
|------|------|-------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
|      |      |       | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         | PAA uygulaması                                      |                         | QAC uygulaması                            |                         |
|      |      |       | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> )           | log KOB/cm <sup>2</sup> | Canlı hücre sayısı (KOB/cm <sup>2</sup> ) | log KOB/cm <sup>2</sup> |
| 25°C | %0,1 | 90 s  | 1,37×10 <sup>3</sup>                                | 3,136                   | 6,76×10 <sup>3</sup>                      | 3,830                   | 830                                                 | 2,919                   | 2,24×10 <sup>3</sup>                      | 3,350                   |
|      |      | 120 s | 300                                                 | 2,478                   | 197                                       | 2,294                   | 114                                                 | 2,059                   | 1,86×10 <sup>3</sup>                      | 3,269                   |
|      | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 25                                                  | 1,399                   | 1,53×10 <sup>3</sup>                      | 3,185                   |
|      |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 14                                                  | 1,156                   | 272                                       | 2,434                   |
|      | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|      |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
| 37°C | %0,1 | 90 s  | 676                                                 | 2,830                   | 404                                       | 2,607                   | 25                                                  | 1,399                   | 0                                         | 0                       |
|      |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 50                                        | 1,700                   | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|      | %0,2 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|      |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|      | %0,3 | 90 s  | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |
|      |      | 120 s | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       | 0                                                   | 0                       | 0                                         | 0                       |

**Çizelge 5.15.** *Listeria monocytogenes* suşlarının PAA uygulamasından sonra pozitif kontrollerine göre logaritmik azalma değerleri (log KOB/cm<sup>2</sup>)

|      |      |                 | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan<br>biyofilm üzerinde |      |      |           | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan<br>biyofilm üzerinde |      |      |          |
|------|------|-----------------|--------------------------------------------------------|------|------|-----------|--------------------------------------------------------|------|------|----------|
|      |      |                 | HL76                                                   | HL98 | HL31 | ATCC 7644 | HL76                                                   | HL98 | HL31 | ATCC7644 |
|      |      | Pozitif kontrol | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
| 25°C | %0,1 | 90 s            | 5,8                                                    | 2,2  | 3,8  | 2,9       | 3,6                                                    | 2,2  | 3,6  | 3,7      |
|      |      | 120 s           | 5,8                                                    | 2,6  | 5,0  | 3,6       | 4,4                                                    | 2,0  | 4,3  | 4,6      |
|      | %0,2 | 90 s            | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 5,3      |
|      |      | 120 s           | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 5,5      |
|      | %0,3 | 90 s            | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
| 37°C | %0,1 | 90 s            | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 3,3       | 5,8                                                    | 3,7  | 5,3  | 5,3      |
|      |      | 120 s           | 5,8                                                    | 2,9  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 3,9  | 5,3  | 6,6      |
|      | %0,2 | 90 s            | 3,9                                                    | 3,0  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 4,6                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
|      | %0,3 | 90 s            | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 5,8                                                    | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                                                    | 5,3  | 5,3  | 6,6      |

**Çizelge 5.16.** *Listeria monocytogenes* suşlarının QAC uygulamasından sonra pozitif kontrollerine göre logaritmik azalma değerleri (KOB log/cm<sup>2</sup>)

|      |      |                 | 48 h'lik inkübasyon sonucu oluşan |      |      |           | 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan |      |      |          |
|------|------|-----------------|-----------------------------------|------|------|-----------|-----------------------------------|------|------|----------|
|      |      |                 | biyofilm üzerinde                 |      |      |           | biyofilm üzerinde                 |      |      |          |
|      |      |                 | HL76                              | HL98 | HL31 | ATCC 7644 | HL76                              | HL98 | HL31 | ATCC7644 |
|      |      | Pozitif kontrol | 5,8                               | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
| 25°C | %0,1 | 90 s            | 5,8                               | 1,8  | 2,2  | 2,3       | 2,0                               | 2,3  | 3,7  | 3,3      |
|      |      | 120 s           | 4,2                               | 2,0  | 5,0  | 3,8       | 2,3                               | 1,3  | 5,3  | 3,3      |
|      | %0,2 | 90 s            | 5,8                               | 2,0  | 2,5  | 6,1       | 3,2                               | 1,3  | 3,1  | 3,4      |
|      |      | 120 s           | 5,8                               | 5,2  | 4,0  | 6,1       | 4,2                               | 5,3  | 5,3  | 4,2      |
|      | %0,3 | 90 s            | 5,8                               | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 5,3  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 5,8                               | 3,0  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 2,3  | 5,3  | 6,6      |
| 37°C | %0,1 | 90 s            | 5,8                               | 3,0  | 5,0  | 3,5       | 2,6                               | 2,1  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 4,4                               | 3,7  | 5,0  | 4,4       | 2,9                               | 2,1  | 5,3  | 6,6      |
|      | %0,2 | 90 s            | 5,8                               | 2,5  | 5,0  | 6,1       | 4,7                               | 2,1  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 5,8                               | 3,5  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 2,1  | 5,3  | 6,6      |
|      | %0,3 | 90 s            | 5,8                               | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 3,1  | 5,3  | 6,6      |
|      |      | 120 s           | 5,8                               | 5,2  | 5,0  | 6,1       | 5,8                               | 5,3  | 5,3  | 6,6      |



**Çizelge 5.17.** *Listeria monocytogenes* suşlarında PAA ve QAC uygulaması sonucunda elde olunan azalma düzeyleri üzerine etki eden faktörlere ilişkin ANOVA sonuçları

| <b>Faktör</b>                      | <b>Kareler Toplamı</b> | <b>Standart Sapma</b> | <b>Kareler Ortalaması</b> | <b>F</b> | <b>p</b> | <b>Kısmi Eta-Kare</b> |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|----------|----------|-----------------------|
| PAA * QAC                          | 16,450                 | 1                     | 16,450                    | 26,524   | <0.001   | 0,143                 |
| Sıcaklık                           | 12,607                 | 1                     | 12,607                    | 20,328   | <0.001   | 0,113                 |
| Uygulama dozu                      | 70,079                 | 2                     | 35,039                    | 56,497   | <0.001   | 0,415                 |
| Uygulama süresi                    | 3,467                  | 1                     | 3,467                     | 5,590    | 0,019    | 0,034                 |
| Uygulanan suşlar                   | 78,608                 | 3                     | 26,203                    | 42,248   | <0.001   | 0,444                 |
| Dezenfektan ile biyofilm           | 2,660                  | 1                     | 2,660                     | 4,289    | 0,040    | 0,026                 |
| Biyofilm * suş                     | 9,669                  | 3                     | 3,223                     | 5,197    | 0,002    | 0,089                 |
| Sıcaklık * biyofilm                | 2,253                  | 1                     | 2,253                     | 3,633    | 0,058    | 0,022                 |
| Dezenfektan * uygulama dozu        | 3,206                  | 2                     | 1,603                     | 2,584    | 0,079    | 0,031                 |
| Dezenfektan * uygulanan suş        | 7,899                  | 3                     | 2,633                     | 4,245    | 0,006    | 0,074                 |
| Uygulanan doz * uygulanan suş      | 14,929                 | 6                     | 2,488                     | 4,012    | 0,001    | 0,131                 |
| Uygulanan doz * uygulanan süre     | 3,537                  | 2                     | 1,768                     | 2,851    | 0,061    | 0,035                 |
| Uygulanan sıcaklık * uygulanan doz | 11,428                 | 2                     | 5,714                     | 9,214    | <0.001   | 0,104                 |
| Uygulanan sıcaklık * uygulanan suş | 3,968                  | 3                     | 1,323                     | 2,132    | 0,098    | 0,039                 |
| R-kare = 0,651                     |                        |                       |                           |          |          |                       |

**Çizelge 5.18.** PAA ve QAC uygulamalarına göre *Listeria monocytogenes* suşlarında ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Dezenfektan | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|-------------|----|----------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|             |    |          |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| PAA         | 96 | 5,17     | 1,08           | 3,278 | 0,001 | 4,986             | 5,304     |
| QAC         | 96 | 4,54     | 1,52           |       |       | 4,401             | 4,718     |

\*Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.19.** Uygulanan sıcaklık düzeylerine göre *Listeria monocytogenes* suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Sıcaklık | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|----------|----|----------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|          |    |          |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| 25°C     | 96 | 4,63     | 1,40           | 2,339 | 0,020 | 4,437             | 4,755     |
| 37°C     | 96 | 5,08     | 1,27           |       |       | 4,950             | 5,267     |

\*Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.20.** PAA ve QAC'nin uygulama dozuna göre *Listeria monocytogenes* suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Uygulama dozu | N  | Ortalama           | Standart Sapma | F      | p*     | %95 Güven Aralığı |           |
|---------------|----|--------------------|----------------|--------|--------|-------------------|-----------|
|               |    |                    |                |        |        | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| %0,1          | 64 | 4,071 <sup>a</sup> | 1,44           | 24,343 | <0.001 | 3,863             | 4,252     |
| %0,2          | 64 | 4,938 <sup>b</sup> | 1,35           |        |        | 4,782             | 5,171     |
| %0,3          | 64 | 5,561 <sup>c</sup> | 0,72           |        |        | 5,327             | 5,716     |

\*ANOVA testi

**Çizelge 5.21.** PAA ve QAC'nin uygulama sürelerine göre *Listeria monocytogenes* suşlarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Süre       | N  | Ortalama | Standart. Sapma | t     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|------------|----|----------|-----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|            |    |          |                 |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| 90 saniye  | 96 | 4,71     | 1,42            | 1,475 | 0,142 | 4,559             | 4,876     |
| 120 saniye | 96 | 5,00     | 1,27            |       |       | 4,828             | 5,145     |

\*Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.22.** *Listeria monocytogenes* suşlarında ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Suş                    | N  | Ortalama | Standart Sapma | F      | p*     | %95 Güven Aralığı |           |
|------------------------|----|----------|----------------|--------|--------|-------------------|-----------|
|                        |    |          |                |        |        | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| HL31 <sup>a</sup>      | 48 | 4,90     | 0,70           | 23,009 | <0.001 | 4,634             | 5,083     |
| HL76 <sup>a,c</sup>    | 48 | 5,27     | 1,07           |        |        | 4,984             | 5,433     |
| HL98 <sup>b</sup>      | 48 | 3,71     | 1,51           |        |        | 3,596             | 4,045     |
| ATCC 7644 <sup>c</sup> | 48 | 5,54     | 1,24           |        |        | 5,296             | 5,745     |

\*ANOVA testi

**Çizelge 5.23.** PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerinin biyofilm yapısında görülen azalma düzeylerine etkisinin ortalama miktarlarının karşılaştırılması

| Süre | Dezenfektan | Ortalama           | Standart Hata | Standart Sapma | t    | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|------|-------------|--------------------|---------------|----------------|------|-------|-------------------|-----------|
|      |             |                    |               |                |      |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| 48 h | PAA         | 5,046 <sup>a</sup> | 0,114         | 1,30           | <0.1 | 0,992 | 4,821             | 5,270     |
|      | QAC         | 4,696 <sup>b</sup> | 0,114         |                |      |       | 4,471             | 4,920     |
| 72 h | PAA         | 5,244 <sup>a</sup> | 0,114         | 1,42           |      |       | 5,019             | 5,468     |
|      | QAC         | 4,423 <sup>b</sup> | 0,114         |                |      |       | 4,198             | 4,647     |

\*Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.24.** *Listeria monocytogenes* suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarında görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Süre | Suş       | Ortalama           | Standart Hata | Standart Sapma | F     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|------|-----------|--------------------|---------------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|      |           |                    |               |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| 48 h | ATCC 7644 | 5,308 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          | 5,197 | <0,05 | 4,991             | 5,626     |
|      | HL31      | 4,688 <sup>b</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,370             | 5,005     |
|      | HL76      | 5,546 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 5,228             | 5,863     |
|      | HL98      | 3,942 <sup>c</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 3,624             | 4,259     |
| 72 h | ATCC 7644 | 5,733 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 5,416             | 6,051     |
|      | HL31      | 5,029 <sup>b</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,712             | 5,347     |
|      | HL76      | 4,871 <sup>b</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,553             | 5,188     |
|      | HL98      | 3,700 <sup>c</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 3,383             | 4,017     |

\*ANOVA testi

**Çizelge 5.25.** *Listeria monocytogenes* suşlarında PAA ve QAC uygulamaları sonucunda görülen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Suş       | Dezenfektan | Ortalama           | Standart Hata | Standart Sapma | F     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|-----------|-------------|--------------------|---------------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|           |             |                    |               |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| HL98      | PAA         | 4,438 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          | 4,245 | <0,05 | 4,120             | 4,755     |
|           | QAC         | 3,204 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 2,887             | 3,522     |
| HL31      | PAA         | 4,988 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,670             | 5,305     |
|           | QAC         | 4,729 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,412             | 5,047     |
| HL76      | PAA         | 5,521 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 5,203             | 5,838     |
|           | QAC         | 4,896 <sup>b</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 4,578             | 5,213     |
| ATCC 7644 | PAA         | 5,633 <sup>a</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 5,316             | 5,951     |
|           | QAC         | 5,408 <sup>b</sup> | 0,161         | 0,773          |       |       | 5,091             | 5,726     |

\*ANOVA testi

**Çizelge 5.26.** *Listeria monocytogenes* suşlarında PAA ve QAC uygulamalarına ait farklı doz seviyelerinin azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Suş       | Doz (%) | Ortalama           | Standart Hata | Standart Sapma | F     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|-----------|---------|--------------------|---------------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|           |         |                    |               |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| ATCC 7644 | 0,1     | 4,363 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          | 4,012 | <0,05 | 3,974             | 4,751     |
|           | 0,2     | 5,850 <sup>b</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 5,461             | 6,239     |
|           | 0,3     | 6,350 <sup>b</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 5,961             | 6,739     |
| HL31      | 0,1     | 4,631 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,242             | 5,020     |
|           | 0,2     | 4,794 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,405             | 5,183     |
|           | 0,3     | 5,150 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,761             | 5,539     |
| HL76      | 0,1     | 4,550 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,161             | 4,939     |
|           | 0,2     | 5,275 <sup>b</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,886             | 5,664     |
|           | 0,3     | 5,800 <sup>b</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 5,411             | 6,189     |
| HL98      | 0,1     | 2,688 <sup>a</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 2,299             | 3,076     |
|           | 0,2     | 3,988 <sup>b</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 3,599             | 4,376     |
|           | 0,3     | 4,787 <sup>c</sup> | 0,197         | 0,788          |       |       | 4,399             | 5,176     |

\*ANOVA testi

**Çizelge 5.27.** Farklı sıcaklık uygulamaları ile PAA ve QAC'nin uygulanma doz seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde gözlemlenen ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

| Sıcaklık | Doz (%) | Ortalama             | Standart Hata | Standart Sapma | F     | p*    | %95 Güven Aralığı |           |
|----------|---------|----------------------|---------------|----------------|-------|-------|-------------------|-----------|
|          |         |                      |               |                |       |       | Alt Sınır         | Üst Sınır |
| 25°C     | 0,1     | 3,459 <sup>a</sup>   | 0,139         | 0,783          | 9,214 | <0,05 | 3,184             | 3,734     |
|          | 0,2     | 4,853 <sup>b</sup>   | 0,139         | 0,783          |       |       | 4,578             | 5,128     |
|          | 0,3     | 5,475 <sup>c</sup>   | 0,139         | 0,783          |       |       | 5,200             | 5,750     |
| 37°C     | 0,1     | 4,656 <sup>a</sup>   | 0,139         | 0,783          |       |       | 4,381             | 4,931     |
|          | 0,2     | 5,100 <sup>a,b</sup> | 0,139         | 0,783          |       |       | 4,825             | 5,375     |
|          | 0,3     | 5,569 <sup>b</sup>   | 0,139         | 0,783          |       |       | 5,294             | 5,844     |

\*ANOVA testi

48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonucu biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* HL31, HL76, HL98 suşları ile *L. monocytogenes* ATCC7644 suşunun farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve farklı sıcaklık derecelerinde PAA ve QAC uygulaması sonrasındaki koloni sayıları (KOB/mL) (Çizelge 5.7., Çizelge 5.8., Çizelge 5.9., Çizelge 5.10.) ile cm<sup>2</sup> başına düşen canlı hücre–sayıları (Çizelge 5.11., Çizelge 5.12., Çizelge 5.13., Çizelge 5.14.) incelendiği zaman, pozitif kontrole oranla bütün suşlarda etkin bir azalma olduğu ve hatta bazı uygulamalarda ortamdaki *L. monocytogenes* hücrelerinin tamamen eradike edildiği saptanmıştır. Bu kapsamda uygulanan dezenfektan türü (PAA ve QAC), *L. monocytogenes* suşlarının inkübasyon süresi (48 h ve 72 h), dezenfektanların uygulanma dozu (%0,1, %0,2 ve %0,3), dezenfektanların uygulanma sıcaklık derecesi (25°C ve 37°C) ile *L. monocytogenes* suşları arasındaki etkileşim istatistiki olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur (Çizelge 5.17.).

48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC uygulaması sonucunda logaritmik azalma değerleri incelendiği zaman ise (Çizelge 5.15., Çizelge 5.16.), benzer şekilde pozitif kontrole oranla canlı hücre sayısında etkin bir azalma sağlandığı ve hatta bazı uygulamalarda ortamdaki *L. monocytogenes* hücrelerinin tamamen eradike edildiği saptanmıştır.

Paslanmaz çelik kuponlar üzerinde PAA ve QAC'nin farklı sıcaklık, süre ve doz uygulamaları sonucunda 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* hücre sayısındaki azalmaya karşı etkileri birbiri ile kıyaslandığı zaman; PAA uygulaması sonrasında saptanan ortalama azalma miktarı (5,17), QAC için belirlenen ortalama azalma miktarından (4,54) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (Çizelge 5.18.). Bu kapsamda PAA'nın, QAC'ye göre daha etkin bir dezenfektan olduğu saptanmıştır.

Tez çalışmasında 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* hücre sayısındaki azalma, iki farklı sıcaklık derecesindeki (25°C ve 37°C) PAA ve QAC uygulamasında tespit edilmiştir. 37°C'de ortalama azalma miktarı 5,08 bulunurken, 25°C ortalama azalma miktarı 4,63 bulunmuştur (Çizelge 5.19.). İki sıcaklık derecesi arasındaki bu fark, istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. 37°C'deki PAA ve QAC uygulamalarının, 25°C'deki uygulamalara kıyasla daha etkin olduğu tespit edilmiştir.



PAA ve QAC'nin farklı uygulama dozlarının (%0,1, %0,2 ve %0,3) 48 h ve 72 h sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* hücre sayısındaki azalmaya karşı gösterdiği etki araştırılmıştır (Çizelge 5.20.). Uygulama doz seviyelerine göre ortalama azalma miktarları incelendiğinde, PAA ve QAC uygulama doz seviyeleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $F=24,343$  ve  $p<0,001$ ). Benzer şekilde ikişerli karşılaştırmalar sonucunda ise, tüm grup ortalamaları birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (Ortalamalar %0,1 için 4,071; %0,2 için 4,938; %0,3 için 5,561). Ortalama değerler incelendiğinde, en etkin uygulama dozu olarak %0,3 tespit edilmiştir.

PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerinin (90 saniye ve 120 saniye) 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* hücre sayısındaki azalmaya karşı gösterdiği etki araştırılmıştır (Çizelge 5.21.). Uygulama sürelerine göre ortalama azalma miktarları arasındaki fark incelendiğinde; 90 saniye için saptanan azalma miktarı ortalaması (4,71) ile 120 saniye ortalaması (5,00) arası fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $t=1,475$  ve  $p=0,142$ ).

48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC'nin farklı uygulama parametrelerine karşı göstermiş olduğu canlı hücre sayılarındaki ortalama azalma miktarları arası fark incelendiğinde, suş türleri arası farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $F=23,009$  ve  $p<0,001$ ) (Çizelge 5.22.). İkişerli karşılaştırmalar sonucunda ise HL98 suş ortalaması, diğer tüm suş ortalamalarından; HL31 ortalaması, HL98 ve ATCC7644 ortalamasından; HL76 ortalaması, HL98 ortalamasından ve son olarak ATCC7644 ortalaması ise HL31 ve HL98 ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. Ortalama değerler incelendiğinde ATCC7644 (5,54) suşu indirgenme oranının en yüksek olduğu suş olarak tanımlanmıştır. Bu suşu sırasıyla HL76 (5,27), HL31 (4,90) ve HL98 (3,71) takip etmiştir.

Tez çalışmasında 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC uygulaması sonucunda indirgenme oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.23.). 48 h'lik inkübasyon süresindeki *L. monocytogenes* sayısındaki azalma miktarı ortalaması ile 72 h'lik inkübasyon süresindeki *L. monocytogenes* sayısındaki azalma miktarı ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $t<0,001$  ve  $p=0,992$ ). Ancak PAA uygulaması sonucu 48 h'lik inkübasyon süresindeki *L. monocytogenes* sayısındaki azalma miktarı ortalaması (5,046), QAC ortalamasından

(4,696) istatistiksel olarak anlamlı büyük bulunmuştur. Benzer şekilde PAA uygulaması sonucu 72 h'lik inkübasyon süresindeki *L. monocytogenes* sayısındaki azalma miktarı ortalaması (5,244), QAC ortalamasından (4,423) istatistiksel olarak anlamlı büyük bulunmuştur. Bu kapsamda hem 48 h ve hem de 72 h'lik inkübasyon sürecindeki *L. monocytogenes* suşlarını eradike edebilmek için en uygun dezenfektanın PAA olduğu görülmüştür.

*L. monocytogenes* suşlarının paslanmaz çelik kuponlar üzerinde 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürecinde oluşturduğu biyofilm yapısında görülen ortalama azalma miktarları karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.24.). İnkübasyon süresine bağlı olarak suşların ortalama azalma miktarları arasındaki fark durumu istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 48 h'lik inkübasyon sonucunda HL31 suşunda görülen ortalama azalma miktarı (4,688) ile HL98 suşuna ait ortalama (3,942), diğer suşlardan istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. 72 h'lik inkübasyon sonucunda ise ATCC7644 suşunda görülen ortalama azalma miktarı (5,733) ile HL98 suşuna ait ortalama (3,700) diğer suşlardan istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.

PAA ve QAC uygulamalarının *L. monocytogenes* suşlarına ve kontrol suşuna karşı göstermiş olduğu etki Çizelge 5.25.'te yer almaktadır. PAA ve QAC uygulamaları sonucunda görülen ortalama azalma miktarları arasındaki farklılık, suşlara göre değişmektedir. HL98 ve HL31 suşlarında PAA ve QAC uygulamalarına ilişkin ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamış olup, HL76 ile ATCC7644 suşlarında PAA'ya ilişkin ortalamalar QAC'ye ilişkin ortalamalardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

*L. monocytogenes* suşları ile PAA ve QAC'nin farklı uygulama dozları birbiri ile karşılaştırıldığı zaman ise, parametrelere ilişkin ortalamalar arası farklılıklar suşlara göre değişmektedir (Çizelge 5.26.). HL31 suşunda farklı uygulama dozlarına ilişkin indirgenme ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (F: 5,197 ve  $p<0,05$ ). HL76 ve ATCC7644 suşlarında ise PAA ve QAC'nin %0,1'lik uygulama doz seviyesine ilişkin ortalama diğer iki seviyeye (%0,2 ve %0,3) ilişkin ortalamadan istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. HL98 suşunda ise PAA ve QAC'nin farklı doz uygulamalarına karşı göstermiş olduğu indirgenme oranı ortalamaları birbirinden

istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. HL31, HL76, HL98 ve ATCC7644 suşlarına PAA ve QAC'nin %0,3'lük uygulaması, en yüksek indirgenme sağlamıştır.

PAA ve QAC'nin farklı uygulama sıcaklık dereceleri (25°C ve 37°C) ile farklı uygulanma doz seviyelerine (%0,1, %0,2 ve %0,3) ilişkin *L. monocytogenes* suşlarında göstermiş olduğu indirgenme oranına ait ortalamalar arası farklılıklar sıcaklık seviyelerine göre değişmektedir (Çizelge 5.27.). 25°C sıcaklıkta uygulanan farklı uygulama dozlarına ilişkin ortalamaların her biri diğer uygulama dozlarına ilişkin ortalamalardan istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. Ancak 37°C sıcaklık seviyesinde %0,1 ile %0,3 doz seviyelerine ilişkin ortalamalar arası fark anlamlı bulunurken, %0,2 seviyesine ilişkin ortalama ise diğer iki uygulama dozuna ilişkin ortalamalar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### **5.7. PERASETİK ASİT İLE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN 96 KUYUCUKLU MİKROPLAKLARDA OLUŞAN BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

*L. monocytogenes* suşlarında PAA ve QAC uygulaması sonucunda 96 kuyucuklu steril mikrolaplarda elde edilen OD değerleri Çizelge 5.28. ve Çizelge 5.29.'da; PAA ve QAC uygulaması sonrası biyofilm yapısında pozitif kontrole göre yüzde azalma değerleri Çizelge 5.30., Çizelge 5.31., Çizelge 5.32. ve Çizelge 5.33.'de; istatistiki analizlere ait veriler ise Çizelge 5.34., Çizelge 5.35., Çizelge 5.36., Çizelge 5.37., Çizelge 5.38. ve Çizelge 5.39.'da yer almaktadır.

**Çizelge 5.28.** 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında PAA ve QAC uygulamasından sonra 48 h'lik biyofilmlerin OD sonuçları\*

|      |       |          | PAA   |       |       |                 | QAC   |       |       |                 |
|------|-------|----------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|-----------------|
|      |       |          | %0,3  | %0,2  | %0,1  | Pozitif kontrol | % 0,3 | %0,2  | %0,1  | Pozitif kontrol |
| 25°C | 90 s  | HL98     | 1,664 | 2,126 | 2,313 | 2,365           | 0,117 | 1,110 | 1,151 | 1,703           |
|      |       | HL76     | 0,695 | 0,834 | 0,986 | 2,107           | 0,365 | 0,741 | 0,876 | 1,059           |
|      |       | HL31     | 0,547 | 0,692 | 0,739 | 1,753           | 0,457 | 0,625 | 0,739 | 0,903           |
|      |       | ATCC7644 | 0,660 | 0,657 | 0,845 | 1,48            | 0,269 | 0,538 | 0,737 | 1,021           |
|      | 120 s | HL98     | 1,182 | 1,236 | 1,290 | 2,365           | 0,726 | 0,893 | 0,903 | 1,703           |
|      |       | HL76     | 0,545 | 0,775 | 0,758 | 2,107           | 0,631 | 0,813 | 0,957 | 1,059           |
|      |       | HL31     | 0,333 | 0,516 | 0,836 | 1,753           | 0,386 | 0,408 | 0,450 | 0,903           |
|      |       | ATCC7644 | 0,519 | 0,516 | 0,555 | 1,48            | 0,394 | 0,468 | 0,452 | 1,021           |
| 37°C | 90 s  | HL98     | 0,111 | 0,132 | 0,193 | 0,377           | 0,116 | 0,166 | 0,154 | 0,570           |
|      |       | HL76     | 0,112 | 0,152 | 0,144 | 0,544           | 0,101 | 0,171 | 0,182 | 1,027           |
|      |       | HL31     | 0,281 | 0,395 | 0,389 | 0,769           | 0,374 | 0,491 | 0,537 | 0,711           |
|      |       | ATCC7644 | 0,233 | 0,336 | 0,434 | 0,942           | 0,414 | 0,452 | 0,505 | 0,721           |
|      | 120 s | HL98     | 0,111 | 0,143 | 0,188 | 0,377           | 0,132 | 0,183 | 0,194 | 0,570           |
|      |       | HL76     | 0,114 | 0,155 | 0,343 | 0,544           | 0,120 | 0,161 | 0,174 | 1,027           |
|      |       | HL31     | 0,208 | 0,288 | 0,411 | 0,769           | 0,283 | 0,457 | 0,547 | 0,711           |
|      |       | ATCC7644 | 0,233 | 0,330 | 0,496 | 0,942           | 0,329 | 0,401 | 0,512 | 0,721           |

\*Her deney setindeki kuyucuk kendi negatif kontrolünden çıkarılarak değerlendirilmiştir.

**Çizelge 5.29.** 25°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında PAA ve QAC uygulamasından sonra 72 saatlik biyofilmlerin OD sonuçları\*

|      |       |           | PAA   |       |       |                 | QAC   |       |       |                 |
|------|-------|-----------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|-----------------|
|      |       |           | %0,3  | %0,2  | %0,1  | Pozitif kontrol | % 0,3 | %0,2  | %0,1  | Pozitif kontrol |
| 25°C | 90 s  | HL98      | 0,356 | 0,575 | 0,956 | 1,434           | 0,661 | 0,573 | 0,647 | 1,292           |
|      |       | HL76      | 0,296 | 0,335 | 0,496 | 0,729           | 0,445 | 0,484 | 0,610 | 0,759           |
|      |       | HL31      | 0,288 | 0,467 | 0,489 | 0,538           | 0,359 | 0,395 | 0,420 | 0,435           |
|      |       | ATCC 7644 | 0,235 | 0,734 | 0,760 | 0,921           | 0,274 | 0,294 | 0,366 | 0,410           |
|      | 120 s | HL98      | 0,277 | 0,326 | 0,386 | 1,214           | 0,310 | 0,353 | 0,346 | 1,292           |
|      |       | HL76      | 0,694 | 0,649 | 0,806 | 1,049           | 0,443 | 0,454 | 0,542 | 0,759           |
|      |       | HL31      | 0,188 | 0,264 | 0,293 | 0,324           | 0,290 | 0,310 | 0,395 | 0,435           |
|      |       | ATCC 7644 | 0,276 | 0,409 | 0,541 | 0,921           | 0,280 | 0,303 | 0,312 | 0,410           |
| 37°C | 90s   | HL98      | 0,111 | 0,140 | 0,245 | 0,318           | 0,111 | 0,104 | 0,107 | 0,270           |
|      |       | HL76      | 0,089 | 0,106 | 0,125 | 0,327           | 0,087 | 0,092 | 0,095 | 0,522           |
|      |       | HL31      | 0,229 | 0,322 | 0,496 | 0,577           | 0,326 | 0,370 | 0,471 | 0,577           |
|      |       | ATCC 7644 | 0,297 | 0,400 | 0,481 | 0,56            | 0,321 | 0,364 | 0,335 | 0,436           |
|      | 120s  | HL98      | 0,116 | 0,147 | 0,176 | 0,318           | 0,115 | 0,125 | 0,116 | 0,270           |
|      |       | HL76      | 0,103 | 0,099 | 0,139 | 0,327           | 0,372 | 0,501 | 0,511 | 0,522           |
|      |       | HL31      | 0,222 | 0,374 | 0,379 | 0,422           | 0,285 | 0,368 | 0,376 | 0,386           |
|      |       | ATCC 7644 | 0,281 | 0,442 | 0,463 | 0,566           | 0,400 | 0,412 | 0,481 | 0,623           |

\*Her deney setindeki kuyucuk kendi negatif kontrolünden çıkarılarak değerlendirilmiştir.

**Çizelge 5.30.** PAA ve QAC uygulamasından sonra HL76 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları

| Sıcaklık | Doz  | Süre  | PAA  |      | QAC  |      |
|----------|------|-------|------|------|------|------|
|          |      |       | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| 25°C     | %0,1 | 90 s  | %53  | %23  | %27  | %19  |
|          |      | 120 s | %64  | %31  | %9,6 | %28  |
|          | %0,2 | 90 s  | %60  | %38  | %30  | %36  |
|          |      | 120 s | %63  | %54  | %23  | %40  |
|          | %0,3 | 90 s  | %67  | %33  | %65  | %41  |
|          |      | 120 s | %74  | %59  | %40  | %41  |
| 37°C     | %0,1 | 90 s  | %73  | %57  | %82  | %81  |
|          |      | 120 s | %36  | %23  | %83  | %2,1 |
|          | %0,2 | 90 s  | %72  | %69  | %83  | %82  |
|          |      | 120 s | %71  | %67  | %84  | %4   |
|          | %0,3 | 90 s  | %79  | %68  | %90  | %83  |
|          |      | 120 s | %79  | %72  | %88  | %28  |

**Çizelge 5.31.** PAA ve QAC uygulamasından sonra HL98 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları

| Sıcaklık | Doz  | Süre  | PAA  |      | QAC  |      |
|----------|------|-------|------|------|------|------|
|          |      |       | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| 25°C     | %0,1 | 90 s  | %2,1 | %33  | %32  | %49  |
|          |      | 120 s | %45  | %22  | %46  | %73  |
|          | %0,2 | 90 s  | %11  | %59  | %34  | %55  |
|          |      | 120 s | %47  | %55  | %47  | %72  |
|          | %0,3 | 90 s  | %29  | %75  | %52  | %48  |
|          |      | 120 s | %50  | %65  | %57  | %76  |
| 37°C     | %0,1 | 90 s  | %48  | %22  | %72  | %60  |
|          |      | 120 s | %50  | %44  | %65  | %57  |
|          | %0,2 | 90 s  | %64  | %55  | %70  | %61  |
|          |      | 120 s | %62  | %53  | %67  | %53  |
|          | %0,3 | 90 s  | %70  | %65  | %76  | %58  |
|          |      | 120 s | %70  | %63  | %79  | %57  |

**Çizelge 5.32.** PAA ve QAC uygulamasından sonra HL31 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları

| Sıcaklık | Doz  | Süre  | PAA  |      | QAC  |      |
|----------|------|-------|------|------|------|------|
|          |      |       | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| 25°C     | %0,1 | 90 s  | %52  | %9   | %18  | %3,4 |
|          |      | 120 s | %57  | %9   | %50  | %9   |
|          | %0,2 | 90 s  | %60  | %13  | %30  | %9,1 |
|          |      | 120 s | %70  | %18  | %54  | %28  |
|          | %0,3 | 90 s  | %68  | %46  | %49  | %2   |
|          |      | 120 s | %81  | %41  | %57  | %31  |
| 37°C     | %0,1 | 90 s  | %46  | %14  | %24  | %18  |
|          |      | 120 s | %49  | %10  | %23  | %57  |
|          | %0,2 | 90 s  | %48  | %44  | %30  | %35  |
|          |      | 120 s | %62  | %41  | %35  | %53  |
|          | %0,3 | 90 s  | %63  | %60  | %47  | %43  |
|          |      | 120 s | %72  | %47  | %60  | %57  |

**Çizelge 5.33.** PAA ve QAC uygulamasından sonra *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu biyofilmlerinde pozitif kontrole göre yüzde azalma sonuçları

| Sıcaklık | Doz  | Süre  | PAA  |      | QAC  |      |
|----------|------|-------|------|------|------|------|
|          |      |       | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| 25°C     | %0,1 | 90 s  | %57  | %17  | %27  | %10  |
|          |      | 120 s | %52  | %41  | %55  | %23  |
|          | %0,2 | 90 s  | %60  | %20  | %47  | %28  |
|          |      | 120 s | %70  | %55  | %54  | %26  |
|          | %0,3 | 90 s  | %68  | %74  | %73  | %33  |
|          |      | 120 s | %81  | %70  | %61  | %33  |
| 37°C     | %0,1 | 90 s  | %49  | %14  | %29  | %23  |
|          |      | 120 s | %46  | %18  | %28  | %26  |
|          | %0,2 | 90 s  | %48  | %28  | %37  | %16  |
|          |      | 120 s | %62  | %21  | %44  | %4,6 |
|          | %0,3 | 90 s  | %63  | %46  | %42  | %20  |
|          |      | 120 s | %72  | %50  | %54  | %26  |

**Çizelge 5.34.** PAA ve QAC uygulaması sonucuna göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

|     | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*    |
|-----|----|----------|----------------|-------|-------|
| PAA | 96 | 50,06    | 20,07          | 1,875 | 0,062 |
| QAC | 96 | 44,25    | 22,83          |       |       |

\* Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.35.** Suş türlerine göre ortalama azalma miktarlarının (%) karşılaştırılması

|           | N  | Ortalama           | Standart Sapma | F     | p*     |
|-----------|----|--------------------|----------------|-------|--------|
| HL31      | 48 | 39,64 <sup>a</sup> | 20,72          | 6,316 | <0.001 |
| HL76      | 48 | 53,64 <sup>b</sup> | 24,75          |       |        |
| HL98      | 48 | 53,65 <sup>b</sup> | 17,11          |       |        |
| ATCC 7644 | 48 | 41,70 <sup>a</sup> | 19,83          |       |        |

\* ANOVA testi

**Çizelge 5.36.** Uygulanan sıcaklık derecelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

|      | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*    |
|------|----|----------|----------------|-------|-------|
| 25°C | 96 | 43,25    | 20,71          | 2,536 | 0,012 |
| 37°C | 96 | 51,06    | 21,93          |       |       |

\* Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.37.** PAA ve QAC'nın uygulanma doz seviyelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

|      | N  | Ortalama           | Standart Sapma | F      | p*     |
|------|----|--------------------|----------------|--------|--------|
| %0,1 | 64 | 37,11 <sup>a</sup> | 21,62          | 16,752 | <0,001 |
| %0,2 | 64 | 46,75 <sup>b</sup> | 20,21          |        |        |
| %0,3 | 64 | 57,61 <sup>c</sup> | 18,15          |        |        |

\* ANOVA testi



**Çizelge 5.38.** PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerine göre ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

|       | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*    |
|-------|----|----------|----------------|-------|-------|
| 90 s  | 96 | 45,54    | 22,42          | 1,037 | 0,301 |
| 120 s | 96 | 48,77    | 20,81          |       |       |

\* Bağımsız iki örneklem t testi

**Çizelge 5.39.** Farklı inkübasyon sürelerinde biyofilm tabakalarının ortalama azalma miktarlarının karşılaştırılması

|      | N  | Ortalama | Standart Sapma | t     | p*     |
|------|----|----------|----------------|-------|--------|
| 48 h | 96 | 54,42    | 18,97          | 4,931 | <0.001 |
| 72 h | 96 | 39,89    | 21,78          |       |        |

\* Bağımsız iki örneklem t testi

PAA ve QAC'nin farklı uygulama dozları, sıcaklıkları ve sürelerinin mikrobiyal ortamlarındaki 48 h ve 72 h'lik biyofilm tabakası üzerine etkileri incelendiği zaman, bütün uygulama parametrelerinde pozitif kontrole oranla önemli ölçüde azalmalar saptanmıştır (Çizelge 5.28., Çizelge 5.29., Çizelge 5.30., Çizelge 5.31., Çizelge 5.32. ve Çizelge 5.33.).

PAA ve QAC'nin mikrobiyal ortamlarda oluşan biyofilm tabakası üzerindeki etkileri Çizelge 5.34.'te gösterilmiştir. Bu kapsamda PAA'nın biyofilm tabakası üzerinde göstermiş olduğu azalma miktarı ortalaması (%50,06) ile QAC'nin ortalaması (%44,25) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (t=1,875 ve p=0,062).

PAA ve QAC uygulaması sonucunda *L. monocytogenes* suşlarında saptanan ortalama azalma miktarları arası fark incelendiğinde, suş türleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (F=6,316 ve p<0,001) (Çizelge 5.35.). *L. monocytogenes* suşlarının ikişerli karşılaştırmaları sonucunda ise, HL76 (53,64) ve HL98 (53,65) suş ortalamaları birbirine benzer bulunurken, diğer iki suş ortalamasından (HL31: 39,64 ve ATCC7644: 41,70) istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. PAA ve QAC uygulaması sonucunda HL76 ve HL98 suşları mikrobiyal ortamlarda en yüksek indirgenmiştir.

PAA ve QAC'nin farklı sıcaklık derecelerinde uygulanması temel alınarak, mikrobiyal ortamlarında biyofilm tabakasındaki ortalama azalma miktarları arası fark incelenmiştir (Çizelge 5.36.). 37°C derece için azalma miktarı ortalaması (51,06), 25°C'deki

ortalamasından (43,25) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ( $t=2,536$  ve  $p=0,012$ ). Mikroplak ortamlarında  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik uygulama sıcaklığının,  $25^{\circ}\text{C}$ 'lik uygulama sıcaklığından daha etkili olduğu saptanmıştır.

PAA ve QAC'nin farklı uygulanma konsantrasyon seviyelerine göre ortalama azalma miktarları arası fark incelendiğinde, doz seviyeleri arası farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $F=16,752$  ve  $p<0,001$ ) (Çizelge 5.37.). Parametrelerin ikişerli karşılaştırmaları sonucunda tüm grup ortalamaları da birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (Ortalamlar %0,1=37,11; %0,2=46,75; %0,3=57,61). Bu kapsamda PAA ve QAC'nin %0,3 doz seviyesi en etkin doz seviyesi olarak tanımlanmıştır.

PAA ve QAC'nin farklı uygulama sürelerinin ortalama azalma miktarları arası fark incelendiğinde; 90 saniye için azalma miktarı ortalaması (45,54) ile 120 saniye ortalaması (48,77) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $t=1,037$  ve  $p=0,301$ ) (Çizelge 5.38).

Farklı inkübasyon sürelerindeki (48 h ve 72 h) biyofilm tabakalarının ortalama azalma miktarları arası fark incelendiğinde (Çizelge 5.39.); 48 h'lik biyofilm tabakası için azalma miktarı ortalaması (54,42) ile 72 h'lik ortalaması (39,89) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $t=4,931$  ve  $p<0,001$ ). 48 h'lik inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm tabakasının PAA ve QAC uygulaması sonucunda elimine edilmesi daha kolay olmuştur. 72 h'lik inkübasyon sonucu oluşan biyofilm tabakaları PAA ve QAC uygulamasına karşı daha toleranslı bulunmuştur.

## 6. TARTIŞMA

### 6.1. ÖRNEKLERDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLASYONU

Tez çalışması kapsamında Nisan 2019 – Şubat 2020 tarihleri arasında yer alan 11 aylık süreçte Ankara ve yakın çevresindeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen izolasyon materyalleri öncelikli olarak *Listeria* spp. varlığı bakımından taranmıştır. ISO 11290-1 protokolü takip edilerek çiğ ve işlem görmüş gıda ürünleri, meyve ve sebze yıkama suları ile gıda işleme yüzeylerinden alınan sürüntü örnekleri *Listeria* spp. varlığı bakımından incelenmiştir. ISO 11290-1 protokolü ön zenginleştirme aşaması içermesi bakımından araştırmalarda en fazla takip edilen yöntemlerdendir (57,106,277–284). Bu yöntemde uygulanan iki aşamadan oluşan zenginleştirme basamağı, hasar görmüş bakteriyel hücrelerin onarılmasına fırsat tanımakta ve pozitif sonuç elde etme olasılığı diğer protokollere göre daha yüksek olarak değerlendirilmektedir (26,57,92).

Analize alınan 180 adet örneğin %39,4'ünde (71 örnek) ALOA ve PALCAM agar ortamlarında *Listeria* spp. bakımından tipik koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Gram boyama, hareketlilik, katalaz ve oksidaz testleri sonucunda ise, toplamda 61 izolat muhtemel *Listeria* spp. olarak değerlendirilmiştir. Muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının 35'i (%57,3) tüketime hazır gıdalardan, 10'u (%16,4) meyve ve sebze yıkama suyundan, 7'si (%11,4) çiğ kırmızı etten, 4'ü (%6,5) çiğ tavuk etinden, 3'ü (%4,9) çiğ süttten ve 2'si (%3,3) ise yüzey swap örneğinden izole edilmiştir. *Listeria* spp. varlığı bakımından analiz edilen gıdalar arasında, tüketime hazır gıdalar en riskli gıda grubu olarak tanımlanmıştır.

Morfolojik ve biyokimyasal olarak muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanan 61 izolata 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. Suşların 29'u (%47,5) *L. monocytogenes*, 18'i (%29,5) *L. innocua*, 9'u (%14,8) *L. grayii* ve 5'i (%8,2) *L. welshimeri* olarak tanımlanmıştır. *L. monocytogenes* suşlarının %48,3'ü tüketime hazır gıdalardan, %20,7'si meyve ve sebze yıkama sularından, %13,8'i çiğ kırmızı etten, %6,9'u çiğ tavuk etinden, %6,9'u yüzey swap örneklerinden ve %3,5'i ise çiğ süttten izole edilmiştir.

*L. monocytogenes* varlığı bakımından da tüketime hazır gıdalar en riskli gıda grubu olarak tanımlanmıştır. Market veya diğer gıda satış noktalarında satışa sunulan ve herhangi bir ek işlem gerektirmeksizin direkt tüketilebilecek gıdalar tüketime hazır gıdalar olarak

nitelendirilmektedir. Bu gıdalar sıcak veya soğuk şekilde tüketilen ve hazırlandıktan sonra ek bir ısıl işlem uygulanmasına gerek olmayan ürünlerdir (80). Shenawy ve ark. (2011), Mısır'da sokakta satılan 576 adet tüketime hazır gıdada *L. monocytogenes* prevalansını %13,1 olarak bulmuşlardır (285). İsveçte Lambertz ve ark. (2012) tarafından 1590 tüketime hazır gıdada *L. monocytogenes* oranı %4,65 olarak saptanmıştır (283). Sant'Ana ve ark. (2012) tarafından Brezilya'da 512 adet paketli tüketime hazır gıdada *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı %3,1 olarak bulunmuştur (286). Jamali ve ark. (2013) tarafından salata bazlı 170 adet tüketime hazır gıdada %14,7 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (277). Gyurova ve ark. (2014) Bulgaristan'da 122 adet tüketime hazır gıdayı analiz etmişler ve bunların %12,3'ünün *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu saptamışlardır (281). Benzer şekilde Malezya'da Jamali ve Thong (2014) tarafından 396 adet tüketime hazır gıda *L. monocytogenes* varlığı bakımından analiz edilmiş ve %11,4'ünün patojen ile kontamine olduğu belirlenmiştir (287). Abdollahzadeh ve ark. (2016) tarafından İran'da benzer bir çalışma yapılmış ve 201 adet tüketime hazır gıdada %2,95 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (288). Coroneo ve ark. (2016) ise, 87 adet tüketime hazır salatada *L. monocytogenes* oranını %17,2 olarak belirlemişlerdir (57). Lakhanpal ve ark. (2016) 120 adet süt bazlı tüketime hazır gıdada *L. monocytogenes* kontaminasyon oranını %2,5 olarak saptamışlardır (289). Şanlıbaba ve ark. (2018) 201 adet tüketime hazır gıdada *L. monocytogenes* kontaminasyon oranını %8,5 olarak tespit etmişlerdir (106). Tez çalışmasında *L. monocytogenes* suşlarının %48,3'ü tüketime hazır gıdalardan izole edilmiş olup, bu oran yukarıda belirtilen literatür verileri ile kıyaslandığı zaman oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda elde olunan bu oran, gıda hazırlama ve depolama aşamalarında hijyenik kurallara uyulmadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında meyve ve sebze yıkama sularından *L. monocytogenes* izolasyon oranı %20,7 olarak bulunmuştur. Literatürde benzer izolasyon kaynaklı bir araştırmaya rastlanmadığı için, bu oranın literatür verileri ile karşılaştırılması yapılamamıştır. *L. monocytogenes*'in meyve ve sebze yıkama sularından yüksek oranda izole edilmesi endişe verici olarak görülmektedir. Meyve ve sebzelerin *L. monocytogenes* ile kontamine olması, hasat aşamasında veya market ve pazarlardaki satış aşamasında çapraz kontaminasyon olabileceği sonucunu düşündürmektedir. Tez çalışmasında elde olunan bu sonuç, taze olarak tüketime sunulan meyve ve sebzelerde etkin bir yıkamanın önemini bir kez daha

göstermiştir. Ayrıca ev tipi sanitizer olarak tanımlanan sirke, limon vb. antimikrobiyel ajanların yıkama sularına eklenmesi de yıkama işleminin etkinliğini artıracaktır. Şengün ve Kılıç (2018) tarafından ev yapımı dut sirkesinin *L. monocytogenes* suşuna karşı 13,5 mm zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir (290). Kocadağ (2021) tarafından yapılan bir araştırmada da *L. monocytogenes* suşlarına karşı antimikrobiyel ajan olarak ticari sirke örnekleri kullanılmış ve 6,0-11,3 mm arasında değişen zon çapları ölçülmüştür. Aynı çalışmada *L. monocytogenes* suşlarının limona karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapı ise 6,0-9,0 mm arasında belirlenmiştir (291).

Gamboa-Marin ve ark. (2012) tarafından 472 adet çiğ et örneğinde, %33,9 oranında *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı saptanmıştır (282). Peter ve ark. (2016) 93 adet çiğ kırmızı ette *L. monocytogenes* varlığını analiz etmişler ve kontaminasyon oranını %6,5 olarak bulmuşlardır (292). Silva ve ark. (2020) 30 adet çiğ kırmızı et örneğinden %54,16 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (293). Chuku ve ark. (2020) 104 adet çiğ kırmızı ette %64,4 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (294). Gebremedhin ve ark. (2021) tarafından ise 450 adet çiğ kırmızı ette *L. monocytogenes* izolasyon oranı %4,4 olarak belirlenmiştir (279). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise, Yücel ve ark. (2005) tarafından 42 adet çiğ kıyma örneğinden %4,7 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (295). Şanlıbaba ve ark. (2020) 80 adet çiğ kırmızı eti *L. monocytogenes* varlığı bakımından analiz etmişler ve kontaminasyon oranını %8,75 olarak bulmuşlardır (296). Yukarıda özetlenmeye çalışılan araştırma sonuçları incelendiği zaman, çiğ kırmızı ette *L. monocytogenes* izolasyon oranı %3,33-64,4 arasında saptanmıştır. Tez çalışmasında %13,8 oranında çiğ kırmızı etten *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Bu oran literatür verileri ile benzerlik göstermektedir.

Pesavento ve ark. (2010) tarafından 53 adet çiğ tavuk örneğinde %23,5 oranında *L. monocytogenes* saptanmıştır (297). Benzer şekilde çiğ tavuk etinde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranının araştırıldığı çalışmalarda, Indrawattana ve ark. (2011) 48 örnekte %10,4; Alonso-Hernando ve ark. (2012) 102 örnekte %24,5; Abd El-Tawab ve ark. (2018) 100 hastalıklı tavuktan temin ettikleri 400 örnekte %13,25; ve Soleimani ve ark. (2019) 100 örnekte %30 oranında izolasyon gerçekleştirmişlerdir (6,95,298,299). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise, Yücel ve ark. (2005) tarafından 26 adet çiğ tavuk etinden %11,5 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (295). Aras ve Ardıç (2015) 115 adet çiğ

hindi etinde *L. monocytogenes* oranını %25,53 olarak tespit etmişlerdir (284). Şanlıbaba ve ark. (2020) tarafından 110 adet çiğ tavuk etinde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı %14,54 olarak belirlenmiştir (296). Çiğ tavuk etinde yurt dışında yapılan çalışmalarda kontaminasyon oranı %0-30 arasında saptanırken, bu oran ülkemiz adresli araştırmalarda %11,5-25,53 arasında saptanmıştır. Tez çalışmasında elde olunan çiğ tavuk etindeki %6,9'luk *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı, yurt dışı kaynaklı araştırmaları destekler niteliktedir. Ancak ülkemizde yapılan benzer araştırma sonuçları ile kıyaslandığı zaman, tez çalışmasında daha düşük kontaminasyon oranı saptanmıştır.

Saludes ve ark. (2015) tarafından altı farklı tüketime hazır gıda üreten fabrikadan toplam 540 adet yüzeylerden ve ekipmanlardan alınan swap örnekleri incelenmiş ve %4 oranında *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı saptanmıştır (300). Mulu ve Pal (2016) 45 adet et kesme tahtasından alınan swap örneklerinden %8,9 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (301). Soleimani ve ark. (2019) 30 adet paslanmaz çelik masadan aldıkları yüzey swap örneklerinde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranını %25 bulmuşlardır (6). Tez çalışmasında gıda kesme tahtaları ve alanlarından alınan yüzey swap örneklerinde saptanan %6,9'luk *L. monocytogenes* ile kontaminasyon oranı, literatür verilerini destekler niteliktedir. Tez çalışmasında elde olunan bu oran, çiğ materyalin kesildiği tahta ve bıçak ile işlenmiş gıda ürünlerinin temas etmemesi gerekliliğini bir kez daha göstermiştir. Gıda üretim aşamasında kullanılan alet ve ekipmanın düzenli olarak her işlem sonucunda etkin bir şekilde temizlenmesi, işlenmiş ve işlenmemiş gıdaların üretim alanında farklı tezgahlarda muhafaza edilmesi, gıda üreticilerinin çiğ gıda ile teması sonrasında ellerini etkin bir şekilde uygun bir dezenfektan kullanarak temizlemesi ve daha sonra işlenmiş gıda ile temas etmesi, alınabilecek tedbirler arasında sayılabilir.

Kalorey ve ark. (2008) 2060 çiğ süt örneğinin %5,1'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu saptamışlardır (302). Benzer şekilde çiğ sütte *L. monocytogenes* kontaminasyon oranının araştırıldığı çalışmalar incelendiği zaman; Moshtaghi ve Mohamadpour (2007) 500 örnekte %1,6, Jami ve ark. (2010) 100 örnekte %4, Konosonoka ve ark. (2012) 244 örnekte %0, Al-Mariri ve ark. (2013) 766 örnekte %41, El-Marnissi ve ark. (2013) 96 örnekte %8,33, Seyoum ve ark. (2015) 343 örnekte %2,04, Botsaris ve ark. (2016) 205 örnekte %0,98, Usman ve ark. (2016) 173 örnekte %52,60, Gohar ve ark. (2017) 75 örnekte %16 oranında kontaminasyon oranı saptanmıştır (280,303–310). Ülkemizde

izolasyon materyali olarak çiğ sütün kullanıldığı araştırmalar ise aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır. Aygun ve Pehlivanlar (2006) Antakya’da 47 adet çiğ sütü analiz etmişler ve hiçbir örnekte *L. monocytogenes* varlığına rastlamamışlardır (311). Taşçı ve ark. (2010) Burdur’da 85 adet çiğ süttten %1,17 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (312). Durmaz ve ark. (2015) Güneydoğu illerinden temin ettikleri 140 çiğ süt örneğinden *L. monocytogenes* izolasyon oranını %2,1 olarak belirlemişlerdir (313). Şanlıbaba ve Uymaz Tezel (2018) tarafından Çanakkale ilinde satışa sunulan 50 adet çiğ süt örneğinde %2 oranında *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı saptamışlardır (106). Şanlıbaba vd. (2018) Ankara’dan temin ettikleri 25 çiğ süttten %12 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (108). Yukarıda özetlenmeye çalışılan çalışmalar incelendiği zaman yurt dışı adresli araştırmalarda çiğ sütte *L. monocytogenes* izolasyon oranı %0-52,60; ülkemiz adresli araştırmalarda ise %0-12 arasında bulunmuştur. Tez çalışmamızda çiğ süttten izole edilen %3,5’lik *L. monocytogenes* oranı yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Gıdalarda başlangıç *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı oldukça düşük olsa bile, gıda maddelerinin içeriği patojenin gelişimini destekler nitelikte bir kompozisyona sahip olması ve ayrıca patojenin buzdolabı sıcaklığında bile canlılığını sürdürüp çoğalmaya devam edebilmesi listeriyozis bakımından en büyük risk etmenleri arasındadır. Gıda maddelerinde *L. monocytogenes* kontaminasyon riskini azaltmak veya yok edebilmek için alınabilecek tedbirler aşağıda maddeler halinde özetlenmeye çalışılmıştır.

- a) Kontamine olduğundan şüphe duyulan hammaddenin kullanılmaması,
- b) Gıdalara yeterli ısı işlem uygulanmalı,
- c) Gıda üretim hattındaki alet ve ekipmanların temizliğinin etkin bir şekilde yapılması,
- d) Gıda üretim aşamasında çiğ hammadde ile tüketime hazır gıda maddelerinin temasının önlenmesi,
- e) Çiğ hammadde ile temas etmiş ekipmanların etkin bir şekilde temizliğinin yapıldığından emin olunmadan tüketime hazır gıdalarda kullanılmaması,
- f) Üretim aşaması ve bu aşamadan sonraki diğer basamaklarda (paketleme, depolama, taşıma vb.) çapraz kontaminasyon riskinin azaltılması,
- g) Hayvan kesim yerlerinin temiz tutulması ve böylelikle çapraz kontaminasyon riskinin azaltılması,

- h) Süt sağım aşamasında hayvan temizliğine ve kullanılan ekipmanların temizliğine dikkat edilmesi,
- i) Gıda üretim hattında çalışan personele düzenli olarak hijyen konusunda gerekli eğitimin verilmesi.

## 6.2. *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIğININ BELİRLENMESİ

Tez çalışmamız kapsamında, virölens gen bölgeleri varlığı açısından değerlendirilen 29 suşun hiçbirinde *fla* genine ait bant bölgesi görülmemiştir. Ancak suşların %72,4'ünde *prfA*, %69'unda *iap*, %48,3'ünde *hlyA*, %34,5'inde *inlA*, %24,2'sinde *fbp* ve %10,3'ünde ise *actA* gen bölgesi varlığı saptanmıştır. Tez çalışmamızda kontrol suş olarak kullanılan *L. monocytogenes* ATCC7644 suşu *actA*, *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *prfA* gen bölgeleri varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilirken, *inlA* ve *fla* gen bölgeleri varlığı bakımından da negatif olarak değerlendirilmiştir.

Internalin grubu, *L. monocytogenes*'in virölens aktivitesini etkileyen en önemli protein ailesidir (52). Internalinler patojenin insan bağırsak epitel hücrelerine invazyonunu kolaylaştıran proteinler olup, *L. monocytogenes*'in bağırsak epitelini aşabilmesi için önemli bir virölens faktördür (110,314,315). *InlA* ve *InlB*, öncelikli olarak konak hücredeki E-kadherin yüzey reseptörlerine bağlanmak suretiyle fagositozu indüklemekte ve daha sonrasında ise patojenin konakçı hücre içirisine girişı modüle edilmektedir (314). *InlA* sadece E-kadherin eksprese eden hücrelerde patojenin hücre içine girişine izin verirken, *InlB* farklı reseptör bölgelerine sahip olduğu için patojenin farklı konak hücrelere girişine olanak sağlamaktadır (61,111,112). Gıda kaynaklı *L. monocytogenes* suşlarında *inlA* bulunma oranının yapıldığı çalışmalar incelendiğı zaman; Moreno ve ark. (2014) 28 suşun %100'ünde, Momtaz ve Yadollahi (2013) 18 suşun %100'ünde, Coroneo ve ark. (2016) 15 suşun %60'ında, Abdollahzadeh ve ark. (2016) 7 suşun %85,7'sinde, Su ve ark. (2019) 120 suşun %42,5'inde, Zakrzewski ve ark. (2020) 7 suşun %100'ünde ve Parussolo ve ark. (2021) 9 suşun %88'inde *inlA* gen bölgesi varlığını tespit etmişlerdir (57, 110, 288, 316–319). Tez çalışmamızda *L. monocytogenes* suşlarının %34,5'inde görülen *inlA* gen bölgesi varlığı, yukarıda özetlenen çalışmalar ile kıyaslandığı zaman çok düşük oranda kaldığı görülmektedir. Bu düşük oranın sebebi olarak, *inlA* gen bölgesinde nokta mutasyonlar



oluştugu ve bu durumunda *L. monocytogenes* suşlarının bağırsak epitel hücrelerine invazyon oranının azalmasına sebebiyet verdiği düşünülmektedir.

Bakteriyel yüzey proteini olan *actA*’nın mikrobiyel hücredeki en önemli fonksiyonu, aktin bazlı hücre içi ve hücreler arası hareketlere yol açmasıdır. Ayrıca plazma zarı ile temas etmesi durumunda da patojenin psödopod benzeri çıkıntılar oluşturmaya yol açmakta ve böylelikle komşu hücreye giriş yapıp hücreden hücreye yayılmaya sebebiyet vermektedir. *L. monocytogenes*’in aktin aktivitesine bağlı olarak gözlemlenen bu hareketliliği sayesinde hem makrofajlara hem de fagositik olmayan konak hücrelere karşı patojenite gösterdiği bilinmektedir. *actA* gen bölgesi varlığından yoksun *L. monocytogenes* mutantlarının hücreden hücreye geçemediği ve böylelikle patojenik özellik göstermediği yapılan fare deneylerinde ispatlanmıştır (116,117). Gıda kaynaklı *L. monocytogenes* suşlarında *actA* bulunma oranının yapıldığı çalışmalar incelendiği zaman; Indrawattana ve ark. (2011) 22 suşun %100’ünde, Momtaz ve Yadollahi (2013) 18 suşun %100’ünde, Coroneo ve ark. (2016) 15 suşun %100’ünde, Zakrzewski ve ark. (2020) 7 suşun %100’ünde ve Parussolo ve ark. (2021) ise 9 suşun %88’inde *actA* gen bölgesi varlığını tespit etmişlerdir (57,95,317–319). Tez çalışmamızda *L. monocytogenes* suşlarının %10,3’ünde görülen *actA* gen bölgesi varlığı, yukarıda özetlenen çalışmalar ile kıyaslandığı zaman çok düşük oranda kaldığı saptanmıştır. Bu düşük oranın sebebi olarak, *actA* gen bölgesinde oluşabilecek nokta mutasyonların olabileceği düşünülmektedir.

*prfA* geni *L. monocytogenes* suşlarının hücre invazyonu ve hücre içi parazitliğini sağlama rol oynayan *plcA*, *plcB*, *actA* ve *hlyA* gibi virülens gen gruplarının transkripsiyonundan ve koordinasyonundan sorumludur. *prfA*’nın ve ona bağlı virülens genlerinin aktivasyonu için ortam sıcaklığının mutlaka 37°C olması gerekmektedir (61,120). Gıda kaynaklı *L. monocytogenes* suşlarında *prfA* bulunma oranının yapıldığı çalışmalar incelendiği zaman; Indrawattana ve ark. (2011) 22 suşun %100’ünde, Momtaz ve Yadollahi (2013) 18 suşun %100’ünde, Moreno ve ark. (2014) 28 suşun %100’ünde, Coroneo ve ark. (2016) 15 suşun %100’ünde ve Zakrzewski ve ark. (2020) 7 suşun %100’ünde *prfA* gen bölgesi varlığını tespit etmişlerdir (57,95,316–318). Tez çalışmamızda *L. monocytogenes* suşlarının %72,4’ünde görülen *prfA* gen bölgesi varlığı, yukarıda özetlenen çalışmalar ile kıyaslandığı zaman çok düşük oranda kaldığı

gözlemlenmiştir. Bu düşük oranın sebebi olarak, *prfA* gen bölgesinde oluşabilecek nokta mutasyonların olabileceği düşünülmektedir.

*L. monocytogenes*'in patojenitesinin tanımlanmasında *hlyA* gen bölgesi, belirteç gen olarak kabul edilmiş olsa da son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda *hlyA* gen bölgesi içermeyen atipik *L. monocytogenes* suşları izole edilmiştir (57,118,320,321). Kargar ve Ghasemi (2009) 56 *L. monocytogenes* suşunun %91,7'sinin, Coreneo ve ark. (2016) 15 suşun %93'ünün, Abdollahzadeh ve ark. (2016) 7 suşun %85,7'sinin *hlyA* gen bölgesi içerdiğini saptamışlardır (57,288,320). Ancak Indrawattana ve ark. (2011) 22 suşun, Momtaz ve Yadollahi (2013) 18 suşun ve Moreno ve ark. (2014) 28 suşun tamamını *hlyA* gen bölgesi varlığı bakımından pozitif olarak tanımlamışlardır (95,316,317). *hlyA* gen bölgesi içinde meydana gelebilecek nokta mutasyonun, patojenik *L. monocytogenes* suşlarını atipik suşlara dönüştürmüş olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmamızda ise *L. monocytogenes* suşlarının %48,3'ü *hlyA* gen bölgesi bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Suşların %51,7'si atipik *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır.

*prfA* tarafından regüle edilemeyen *iap* gen bölgesi, bütün *Listeria* spp. suşlarında varlığı tanımlanan ekstraselüler bir protein olan p60'ı kodlamaktadır. p60 proteini *L. monocytogenes* suşlarının memeli hücrelerine adsorbe olmasını ve patojenin hücre içine alınımını sağlamaktadır. *L. monocytogenes* suşlarında p60 proteini murein hidrolaz aktivitesine sahip olup, diğer listeriyal suşlar ise bu aktiviteyi gösterememektedir (11,322). Indrawattana ve ark. (2011), Momtaz ve Yadollahi (2013) ve Zakrzewski ve ark. (2020) izole ettikleri *L. monocytogenes* suşlarının tamamında *iap* gen bölgesi varlığını tanımlarken; Coreneo ve ark. (2015) izole ettikleri *L. monocytogenes* suşlarının %47'sinde ve Parussolo ve ark. (2021) ise %88,8'inde *iap* gen bölgesi varlığını saptamışlardır (57,95, 317–319). Tez çalışmamızda ise *L. monocytogenes* suşlarının %69'unda *iap* gen bölgesi varlığı belirlenmiştir.

Fibronektin bağlanma proteini olarak da ifade edilen *fbp* geni ökaryotik hücrelerde adezyon vb. süreçlerde kritik bir role sahip olmasına rağmen, aynı zamanda bakterilerin hücrel yüzeylere bağlanmasında da yaygın olarak kullanılan bir substrat görevi görmektedir (119). *fbp* geninin yüzey değişikliklerine karşı uyum sağlamada önemli olduğu, bununla beraber çevresel stres koşulları altında *fbp* gen ekspresyonunun

değişebileceği ifade edilmektedir (323). Tez çalışmamızda izole ettiğimiz *L. monocytogenes* suşlarının %24,2'sinde *fbp* gen bölgesi varlığı saptanmıştır. *L. monocytogenes* suşlarında virülens faktörlerin bulunma sıklığının araştırıldığı çalışmalarda, *fbp* gen bölgesi varlığını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan tez çalışmamızda elde olunan bu veri, ileride yapılması planlanan çalışmalara kaynak gösterilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Tez çalışmasında izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının tamamı *fla* geni varlığı bakımından negatif olarak değerlendirilmiştir. *fla* geninin *L. monocytogenes* suşlarında 30°C'nin altındaki inkübasyon sıcaklıklarında eksprese edildiği, ancak 35°C'lik inkübasyonda ise eksprese edilemediği bilinmektedir (218,324–326). Tez çalışmamızda 35°C'lik inkübasyon sıcaklık derecesi kullanılmıştır. Bu kapsamda elde ettiğimiz sonuç, literatürler bilgisini destekler niteliktedir.

### **6.3. LISTERIA MONOCYTOGENES SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmamız kapsamında 96 kuyucuklu mikrolaplarda 24 h, 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürelerinin sonunda 29 adet adet *L. monocytogenes* suşu ile bir adet *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşunun tamamı biyofilm oluşturma yeteneği açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. 24 h'lik inkübasyon sonunda suşların 7 tanesi zayıf, 18 tanesi orta ve 4 tanesi güçlü biyofilm üreticisi olarak saptanmıştır. 48 h'lik inkübasyon sonunda suşların 18 tanesi orta ve 11 tanesi ise güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. 72 h'lik inkübasyon sonunda ise suşların 1 tanesi zayıf, 17 tanesi orta ve 11 tanesi ise güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlenmiştir. ATCC7644 kontrol suşunun ise her 3 inkübasyon süresi sonunda orta dereceli biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Suşların biyofilm üretme yetenekleri birbiri ile kıyaslandığı zaman (Çizelge 5.5);

- Her üç inkübasyon süresi sonunda da *L. monocytogenes* suşlarından 10 tanesi (HL3, HL19, HL22, HL33, HL48, HL49, HL52, HL58, HL84, HL118) orta dereceli biyofilm üreticisi suş,
- Her üç inkübasyon süresi sonunda da *L. monocytogenes* suşlarından 3 tanesi (HL31, HL76, HL98) güçlü biyofilm üreticisi suş,

- *L. monocytogenes* suşlarının 5 tanesi (HL29, HL46, HL65, HL71, HL80) 24 h'lik inkübasyon sonunda orta ve 48 ile 72 h'lik inkübasyon sonunda ise güçlü biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 5 tanesi (HL27, HL130, HL136, HL164, HL165) 24 h'lik inkübasyon sonunda zayıf ve 48 ile 72 h'lik inkübasyon sonunda ise orta biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 2 tanesi (HL15, HL55) 24 ve 48 h'lik inkübasyon sonunda orta ve 72 h'lik inkübasyon sonunda ise güçlü biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 1 tanesi (HL8) 24 h'lik inkübasyon sonunda zayıf ve 48 ile 72 h'lik inkübasyon sonunda ise güçlü biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 1 tanesi (HL147) 24 h'lik inkübasyon sonunda orta, 48 h'lik inkübasyon sonunda güçlü ve 72 h'lik inkübasyon sonunda ise orta biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 1 tanesi (HL159) 24 ve 48 h'lik inkübasyon sonunda orta ve 72 h'lik inkübasyon sonunda ise zayıf biyofilm üreticisi suş,
- *L. monocytogenes* suşlarının 1 tanesi (HL106) 24 ve 48 h'lik inkübasyon sonunda güçlü ve 72 h'lik inkübasyon sonunda ise orta biyofilm üreticisi suş olduğu görülmüştür.

Yukarıda açıklanan sonuçlar incelendiği zaman suşların büyük bir kısmının, inkübasyon süresinin artmasına paralel olarak biyofilm oluşturma derecesinin de arttığı görülmektedir. Ancak 3 suşun (HL106, HL147, HL159) 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üretme yeteneğinde görülen azalma ise literatür ile uyumlu bulunmuştur (122). Bu durumda biyofilmin olgunlaşma aşamasından sonra hücrelerin biyofilm yapısından ayrılarak serbest kaldığı veya yakın bir yüzeye yeniden tutunduğu düşünülmektedir.

Aynı türe dahil suşlar arasında bile biyofilm üretme yetenekleri arasında farklılıklar olabilmektedir. Biyofilm oluşturma kapasitesi üzerine biyofilmin yaşı, biyofilm yıkama işleminin sayısı, bazı suşların olgun biyofilm yapısından ayrılması ve çeşitli çevresel faktörler gibi parametreler etki etmektedir (9,228). Tez çalışmamızda elde olunan sonuçlar literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur.

#### 6.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINDA VİRÜLENS GEN BÖLGELERİ VARLIĞININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİ İLE KIYASLANMASI

Tez çalışmasında 29 adet *L. monocytogenes* suşunda *hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA* ve *flaA* olmak üzere toplam 7 adet virülens gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır. *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşu *actA*, *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *prfA* gen bölgeleri varlığı bakımından pozitif olarak tanımlanırken, *inlA* ve *flaA* gen bölgeleri varlığı bakımından ise negatif olarak değerlendirilmiştir. 29 adet *L. monocytogenes* suşunda virülens gen bölgesinin hepsini genomunda içeren suş saptanamamıştır. Sadece HL130 suşu altı adet virülens gen bölgesini (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA*) içermesi bakımından, diğer suşlardan farklılık göstermiştir. Benzer şekilde HL19, HL58 ve HL159 suşları ise dört adet virülens gen bölgesi içerdiği belirlenmiştir. Bu suşlardan HL19 *hlyA*, *actA*, *inlA* ve *prfA*; HL58 *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *prfA*; HL159 ise *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *inlA* genleri açısından pozitif olarak bulunmuştur.

*hlyA*, *inlA* ve *prfA* gen bölgelerinin *L. monocytogenes* suşlarında biyofilm oluşum sürecindeki rolü üzerine önemli etkileri bulunduğu yönünde birçok araştırma yapılmıştır (214,218,221,222,237,314,327,328). Tez çalışmasında suşların %72,4'ünde *prfA* ve %48,3'ü ise *hlyA* gen bölgesi varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm üretme yetenekleri 3 farklı inkübasyon süreci sonunda (24 h, 48 h ve 72 h) ayrı ayrı araştırılmış ve bu kapsamda her üç inkübasyon süresi sonunda da HL31, HL76 ve HL98 suşları güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. HL31 ve HL98 suşları *prfA* gen bölgesini içerirken, *hlyA* gen bölgesini içermemektedir. HL76 suşu ise sadece *iap* gen bölgesi içermektedir. HL31 ve HL98 suşlarında biyofilm üretim sürecini büyük bir ihtimalle *prfA* gen bölgesi varlığı desteklemektedir. Ancak bu iddiayı desteklemek için, bu suşların *prfA* mutantları üzerinde biyofilm üretim denemelerinin yapılması mutlaka zorunludur. Tez çalışması kapsamında bu denemeler planlanmamıştır. HL76 suşunun ise *hlyA* ve *prfA* gen bölgelerini içermediği halde, güçlü biyofilm üreticisi olarak saptanması yukarıda belirtilen literatür bilgilerini desteklememektedir. HL76 suşunun mutant formuna ait biyofilm üretme yeteneği araştırılmalı ve ayrıca *iap* gen bölgesinin bu süreçteki rolünün ortaya konulması gerekmektedir. Benzer şekilde tez çalışması kapsamında bu denemeler planlanmamıştır.

*L. monocytogenes* suşlarının virülens gen bölgelerini içirme durumu ile bu suşların biyofilm üretme dereceleri arasındaki ilişki incelendiği zaman, sadece *hlyA* gen bölgesi varlığı ile 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üretim durumu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Ki-kare=7,455 ve p=0,021). Diğer virülens gen bölgelerinin varlığı ile biyofilm oluşturma derecesi arasında ise istatistiki olarak bir fark bulunamamıştır. HL19, HL22, HL27, HL33, HL46, HL52, HL58, HL80, HL84, HL118, HL130, HL147, HL159 ve HL164 suşlarında *hlyA* gen bölgesi varlığı saptanmıştır. HL19, HL22, HL27, HL33, HL52, HL58, HL84, HL118, HL130, HL147 ve HL164 suşları orta derecede biyofilm üreticisi olarak saptanırken, HL46 ve HL80 suşları ise güçlü biyofilm üreticisi suşlar olarak saptanmıştır. Ancak HL159 suşu *hlyA* gen bölgesi varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilirken, zayıf biyofilm üreticisi olarak saptanması tez çalışmasından elde olunan ilginç veriler arasındadır. HL159 suşunun içerdiği diğer virülens gen bölgelerinin (*fbp*, *iap* ve *inlA*) biyofilm oluşum sürecindeki rolünün belirlenmesi amacıyla mutlaka mutant denemelerinin yapılması zorunludur. Tez çalışması kapsamında bu denemeler planlanmamıştır.

#### **6.5. PERASETİK ASİT VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN PASLANMAZ ÇELİK KUPONLARDAKİ CANLI BİYOFİLM HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmamızda, PAA ve QAC' nin paslanmaz çelik kuponlardaki canlı biyofilm hücreleri üzerinde etkinliği farklı parametreler denenerek araştırılmıştır. Paslanmaz çelik kuponlar üzerinde en etkili dezenfektan olarak PAA saptanmıştır. PAA ve QAC'nin 37°C'de daha etkin bir şekilde canlı hücreleri eradike ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde PAA ve QAC'nin en etkili uygulama dozunun %0,3 olduğu tespit edilmiştir. Ancak suşların 90 saniye veya 120 saniye uygulanmasının canlı hücreler üzerinde eradikasyon düzeyi incelendiği zaman, aradaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC'nin farklı uygulama parametrelerine karşı göstermiş olduğu canlı hücre sayılarındaki ortalama azalma miktarları arası farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu kapsamda ATCC7644 suşu PAA ve QAC uygulaması sonucunda indirgenme oranının en yüksek olduğu suş olarak tanımlanmıştır. Bu suşu sırasıyla HL76, HL31 ve HL98 takip etmiştir.

Kostaki ve ark. (2012), paslanmaz çelik yüzeylerde 10 ppm'lik PAA'nın 6 dk'lık uygulanması sonrasında *L. monocytogenes* biyofilmlerinin canlı hücrelerine karşı %65'lik (4,8 log KOB/cm<sup>2</sup>) bir azalma sağladığını bulmuşlardır (329). Veluz ve ark. (2014), tavuk işleme tesislerinde çeşitli yüzeylerde oluşan bakteriyel biyofilmlerin canlı hücrelerine karşı 200 ppm'lik QAC'nin etkinliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda 200 ppm QAC'nin 10 dk'lık uygulanmasından sonra paslanmaz çelik yüzeylerdeki canlı hücre sayısında 3 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gösterdiğini belirtmişlerdir (330). Lee ve ark. (2016), paslanmaz çelik yüzeylerde ve mikrotitre plaklarda oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerine karşı %0,5 konsantrasyondaki PAA'nın 15 saniye, 30 saniye, 60 saniye ve 120 saniyelik uygulama sürelerindeki etkinliklerini araştırmışlardır (331). Denemede kullanılan tüm suşların 15 saniye içinde hasar gördüğü, 30 saniye sonra ise canlı hücrelerin neredeyse %100'ünün inaktive olduğunu belirtmişlerdir. Hua ve ark. (2019), paslanmaz çelik, düşük yoğunluklu polietilen (LDPE), polivinil klorür (PVC), polyester (PET) ve kauçuk gibi çeşitli yüzeylerde oluşan *L. monocytogenes* biyofilmlerindeki canlı hücrelere karşı QAC ve PAA'nın etkinliklerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda 200 ppm'lik PAA'nın ve 400 ppm'lik QAC'nin 5 dk süreyle uygulanmasından sonra biyofilm hücrelerinde sırasıyla 4,0-4,5 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 3,0-3,7 log KOB/cm<sup>2</sup>'lik azalma sağlandığını bulmuşlardır. Yukarıda özetlenmeye çalışılan literatür verileri, tez çalışmasında elde olunan verileri destekler niteliktedir (243).

PAA, son yıllarda gıda endüstrisinde sıklıkla tercih edilen güçlü bir dezenfektandır. Biyofilm eradikasyonunda başarılı olması, çelik yüzeylerde düşük oranda aşındırıcılık niteliğinin olması, sert suya tolerans göstermesi ve uygun biyolojik bozunabilirlik özelliğine sahip olması gibi faktörler, PAA'nın tercih edilme sebepleri arasındadır (332). Tez çalışmasında da PAA'nın QAC'ye oranla daha etkili bulunması literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir.

## **6.6. PERASETİK ASİT (PAA) VE KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİNİN 96 KUYUCUKLU MİKROPLAKLARDA OLUŞAN BİYOFİLM YAPISI ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Tez çalışmamızda, PAA ve QAC' nin 96 kuyucuklu mikropalak ortamlarındaki canlı biyofilm hücreleri üzerinde etkinliği farklı parametreler denenerek araştırılmıştır. Mikropalak ortamlarında PAA ve QAC'nin biyofilm hücreleri üzerine etkinlikleri birbiriyle

kıyaslandığı zaman, istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. PAA ve QAC'nin 37°C'de daha etkin bir şekilde canlı hücreleri eradike ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde PAA ve QAC'nin en etkili uygulama dozunun %0,3 olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm kütleindeki canlı hücreler üzerinde PAA ve QAC'nin 90 saniye ve 120 saniye süreyle uygulanması, mikrobiyel hücrelerin eradikasyon düzeyi arasında istatistiki olarak bir fark yaratmamıştır. 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürelerindeki biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC'nin farklı uygulama parametrelerine karşı göstermiş olduğu ortalama azalma miktarları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu kapsamda 48 h'lik inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm tabakası PAA ve QAC uygulaması sonucunda daha kolay eradike edilmiştir. HL76 ve HL 98 suşları mikropalak ortamlarda PAA ve QAC uygulaması sonucunda indirgenme oranının en yüksek olduğu suşlar olarak tanımlanmıştır. Bu suşu sırasıyla ATCC7644 ve HL31 suşları takip etmiştir.

Korany ve ark. (2018), polisistren mikropalaklarda oluşan *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerinde QAC'nin etkinliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla 48 h'lik biyofilmlere 1'er dk boyunca 100 ppm ve 400 ppm konsantrasyonunda QAC uygulanmıştır. Canlı hücre sayısında sırasıyla 2,4 log ve 3,6 log'luk bir azalma saptanmıştır (333). Aryal ve Muriana (2019), 96 kuyucuklu mikropalakta oluşan *L. monocytogenes* biyofilmleri üzerine çeşitli dezenfektanların etkinliklerini araştırmışlardır (228). Bu amaçla QAC, hidrojen peroksit ve diasetilinin biyofilm tabakası üzerindeki etkisini gözlemlemişlerdir. Dezenfektanlar tek başlarına kullanıldığında en düşük etkinliğin QAC'ye ait olduğunu ve ayrıca 30 saniye, 60 saniye, 1 dk'lık uygulamadan sonra canlı hücre sayısında 1-2 log'luk azalma olduğunu belirlemişlerdir. Tez çalışmasında elde olunan veriler, yukarıda özetlenmeye çalışılan literatür verilerini destekler niteliktedir.

Ülkemiz adresli araştırmalarda *L. monocytogenes* suşlarının 96 kuyucuklu mikropalaklarda biyofilm oluşturma kapasitesini araştıran çok sayıda çalışma olmasına rağmen, literatürde çeşitli dezenfektanların bu ortamdaki etkinliğini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan tez çalışmamız özgünlük taşımakta ve ülkemiz adresli ileride yapılacak olan çalışmalara veri sağlaması bakımından da önem taşımaktadır.



## 7. SONUÇ

1. Tez çalışması kapsamında Nisan 2019 – Şubat 2020 tarihleri arasında Ankara ve yakın çevresindeki market, pazar ve gıda işletmelerinden temin edilen toplam 180 adet izolasyon materyali ISO 11290-1 protokolü takip edilerek *Listeria* spp. varlığı bakımından taranmıştır.
2. Morfolojik ve biyokimyasal olarak muhtemel *Listeria* spp. olarak tanımlanan 61 izolata 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. Suşların 29'u (%47,5) *L. monocytogenes*, 18'i (%29,5) *L. innocua*, 9'u (%14,8) *L. grayii* ve 5'i (%8,2) *L. welshimeri* olarak tanımlanmıştır.
3. *L. monocytogenes* suşlarının %48,3'ü tüketime hazır gıdalardan, %20,7'si meyve ve sebze yıkama sularından, %13,8'i çiğ kırmızı etten, %6,9'u çiğ tavuk etinden, %6,9'u yüzey swap örneklerinden ve %3,5'i ise çiğ süttten izole edilmiştir. *L. monocytogenes* varlığı bakımından tüketime hazır gıdalar en riskli gıda grubu olarak tanımlanmıştır.
4. Virülens gen bölgeleri varlığı açısından değerlendirilen 29 *L. monocytogenes* suşunun hiçbirinde *fla* genine ait bant bölgesi görülmemiştir. Ancak suşların %72,4'ünde *prfA*, %69'unda *iap*, %48,3'ünde *hlyA*, %34,5'inde *inlA*, %24,2'sinde *fbp* ve %10,3'ünde ise *actA* gen bölgesi varlığı saptanmıştır. Tez çalışmasında kontrol suş olarak kullanılan *L. monocytogenes* ATCC7644 suşu ise *actA*, *fbp*, *iap*, *hlyA* ve *prfA* gen bölgeleri varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilirken, *inlA* ve *fla* gen bölgeleri varlığı bakımından da negatif olarak değerlendirilmiştir. 29 adet *L. monocytogenes* suşunda virülens gen bölgesinin hepsini genomunda içeren suş saptanamamıştır. Sadece HL130 suşu altı adet virülens gen bölgesini (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *fbp*, *iap*, *prfA*) içermesi bakımından, diğer suşlardan farklılık göstermiştir.
5. Tez çalışmasında suşların %72,4'ünde *prfA* ve %48,3'ü ise *hlyA* gen bölgesi varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm üretme yetenekleri 3 farklı inkübasyon süreci sonunda (24 h, 48 h ve 72 h) ayrı ayrı araştırılmış ve bu kapsamda her üç inkübasyon süresi sonunda da HL31, HL76 ve HL98 suşları güçlü biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. HL31 ve HL98 suşları *prfA* gen bölgesini içerirken, *hlyA* gen bölgesini içermemektedir. HL76 suşu ise

sadece *iap* gen bölgesi içermektedir. HL31 ve HL98 suşlarında biyofilm üretim sürecini büyük bir ihtimalle *prfA* gen bölgesi varlığının desteklediği düşünülmektedir. HL76 suşunun ise *hlyA* ve *prfA* gen bölgelerini içermediği halde, güçlü biyofilm üreticisi olarak saptanması literatür bilgilerini desteklememektedir. HL76 suşunun mutant formuna ait biyofilm üretme yeteneği araştırılmalı ve ayrıca *iap* gen bölgesinin bu süreçteki rolünün ortaya konulması gerekmektedir.

6. *L. monocytogenes* suşlarının virülens gen bölgelerini içerme durumu ile bu suşların biyofilm üretme dereceleri arasındaki ilişki incelendiği zaman, sadece *hlyA* gen bölgesi varlığı ile 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üretim durumu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer virülens gen bölgelerinin varlığı ile biyofilm oluşturma derecesi arasında ise istatistiki olarak bir fark bulunamamıştır.
7. 96 kuyucuklu mikropklarda 24 h, 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürelerinin sonunda 29 adet *L. monocytogenes* suşu ile bir adet *L. monocytogenes* ATCC7644 kontrol suşunun biyofilm oluşturma yeteneği açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. HL31, HL76 ve HL98 suşları her üç inkübasyon süresi sonunda da güçlü üretici suş olarak tanımlanmıştır.
8. Paslanmaz çelik kuponlarda ve 96 kuyucuklu steril mikropklak ortamlarında 48 h ve 72 h'lik inkübasyon süreleri sonunda oluşan biyofilm yapısı üzerinde PAA ve QAC'nin etkinlik düzeyleri farklı konsantrasyonlarda (%0,1, %0,2 ve %0,3), farklı sürelerde (90 ve 120 saniye) ve farklı sıcaklık derecelerinde (25°C ve 37°C) test edilmiştir.
9. Tez çalışmamızda, PAA ve QAC' nin paslanmaz çelik kuponlardaki canlı biyofilm hücreleri üzerinde etkinliği farklı parametreler denenerek araştırılmıştır.
  - En etkili dezenfektan olarak PAA saptanmıştır.
  - PAA ve QAC'nin 37°C'de daha etkin bir şekilde canlı hücreleri eradike ettiği belirlenmiştir.
  - PAA ve QAC'nin en etkili uygulama dozunun %0,3 olduğu tespit edilmiştir.
  - Suşların PAA ve QAC ile 90 saniye veya 120 saniye süreyle uygulanmasının canlı hücreler üzerinde eradikasyon düzeyi incelendiği zaman, aradaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

- 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sonunda biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC'nin farklı uygulama parametrelerine karşı göstermiş olduğu canlı hücre sayılarındaki ortalama azalma miktarları arası farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu kapsamda ATCC7644 suşu PAA ve QAC uygulaması sonucunda indirgenme oranının en yüksek olduğu suş olarak tanımlanmıştır. Bu suşu sırasıyla HL76, HL31 ve HL98 takip etmiştir.
- 10.** Tez çalışmamızda, PAA ve QAC' nin 96 kuyucuklu mikropalak ortamlarındaki canlı biyofilm hücreleri üzerinde etkinliği farklı parametreler denenerek araştırılmıştır.
- Mikropalak ortamlarında PAA ve QAC'nin biyofilm hücreleri üzerine etkinlikleri birbiriyle kıyaslandığı zaman, istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.
  - PAA ve QAC'nin 37°C'de daha etkin bir şekilde canlı hücreleri eradike ettiği belirlenmiştir.
  - PAA ve QAC'nin en etkili uygulama dozunun %0,3 olduğu tespit edilmiştir.
  - Biyofilm kütlesindeki canlı hücreler üzerinde PAA ve QAC'nin 90 saniye ve 120 saniye süreyle uygulanması, mikrobiyel hücrelerin eradikasyon düzeyi arasında istatistiki olarak bir fark yaratmamıştır.
  - 48 h ve 72 h'lik inkübasyon sürelerindeki biyofilm üreticisi *L. monocytogenes* suşlarının PAA ve QAC'nin farklı uygulama parametrelerine karşı göstermiş olduğu ortalama azalma miktarları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu kapsamda 48 h'lik inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm tabakası, PAA ve QAC uygulaması sonucunda daha kolay eradike edilmiştir. HL76 ve HL98 suşları mikropalak ortamlarda PAA ve QAC uygulaması sonucunda indirgenme oranının en yüksek olduğu suşlar olarak tanımlanmıştır. Bu suşu sırasıyla ATCC7644 ve HL31 suşları takip etmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Pınar Ş. Gıdalarda *Listeria monocytogenes* ' in Biyokontrolünde Faj Uygulaması Application of Bacteriophage for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Foods. 2015;13(1):81–8.
2. Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Appl Environ Microbiol. 2009;75(1):93–100.
3. Halkman AK, Broth F. Gıdalarda Lateral Akış Testi ile Detection of *Listeria*. 2010;35:121–6.
4. Yavuz M, Korukluo M. *Listeria monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg. 2010;24(1):1–10.
5. Leverentz B, Conway WS, Camp MJ, Janisiewicz WJ, Abuladze T, Yang M, et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Appl Environ Microbiol. 2003;69(8):4519–26.
6. Soleimani M, Sadrabad EK, Hamidian N, Heydari A, Mohajeri FA. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria Monocytogenes* in Chicken Meat Retailers in Yazd, Iran. J Environ Heal Sustain Dev. 2019;4(4):895–902.
7. Ranjbar R, Halaji M. Epidemiology of *Listeria monocytogenes* prevalence in foods, animals and human origin from Iran: A systematic review and meta-analysis. BMC Public Health. 2018;18(1).
8. CDC. No Title. <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
9. Osman KM, Kappell AD, Fox EM, Orabi A, Samir A. Resistance , and Phylogenetic Analysis of Biofilm-Producing *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Ecological Niches in Egypt : Food , Humans , Animals , and Environment.
10. Henriques AR, Telo da Gama L, Fraqueza MJ. Assessing *Listeria monocytogenes*

- presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Res Int* [Internet]. 2014;63:81–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.035>
11. Aalto-Araneda M, Lundén J, Markkula A, Hakola S, Korkeala H. Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with *Listeria monocytogenes* occurrence in ready-to-eat fish products. *Food Microbiol* [Internet]. 2019;82(September 2018):455–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.017>
  12. Mazaheri T, Cervantes-Huamán BRH, Bermúdez-Capdevila M, Ripolles-Avila C, Rodríguez-Jerez JJ. *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: Is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? *Microorganisms*. 2021;9(1):1–19.
  13. Camargo AC, de Paula OAL, Todorov SD, Nero LA. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016;178(6):1239–51.
  14. Fagerlund A, Moretro T, Heir E, Briandet R, Langsrud S, Møretrø T, et al. Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(17):1–21.
  15. Wallace BYTC, Velasco A, Lay T, Zhang J, Tromp J, Tape C, et al. BIOEKXYΛΙΣΗ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΥΜΑΤΩΝ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝNo Title. *Bull Seismol Soc Am* [Internet]. 2016;106(1):6465–89. Available from: <http://www.bssaonline.org/content/95/6/2373%5Cnhttp://www.bssaonline.org/content/95/6/2373.short%0Ahttp://www.bssaonline.org/cgi/doi/10.1785/0120110286%0Ahttp://gji.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gji/ggv142%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/s00024-01>
  16. Temel A, Eraç B. Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg*. 2018;48(1):1–13.

17. Diani M. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan Enterokokal biyofilm yapısının doğası The nature of Enterococcal biofilm structure , a risk factor for human and animal health. 2016;73(1):71–80.
18. Alsheikh ADI, Mohammed GE, Abdalla MA. First isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from fresh raw dressed broiler chicken in Sudan. Res J Microbiol. 2012;7(6):319–26.
19. Taha Said Ahmed SS, Ahmed Tayeb B. Isolation and Molecular Detection of *Listeria monocytogenes* in Minced Meat, Frozen Chicken and Cheese in Duhok Province, Kurdistan Region of Iraq. J Food Microbiol Saf Hyg. 2017;02(01):10–3.
20. Papaioannou E, Giaouris ED, Berillis P, Boziaris IS. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. Int J Food Microbiol [Internet]. 2018;267(September 2017):9–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.020>
21. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol. 2006;55(6):645–59.
22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/1637/>. No Title. ncbi. 2021.
23. Buchrieser C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. 2007;9:1147–55.
24. Rocourt, J. and Buchrieser C. No Title. In: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 2007.
25. Wellinghausen N. No Title *Listeria* and *Erysipelothrix*,. In: Manual of Clinical Microbiology 11th Edition. 2015. p. 462-473,.
26. Barre L, Angelidis AS, Boussaid D, Brasseur ED, Manso E, Gnanou Besse N. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. Int J Food Microbiol [Internet].

- 2016;238:281–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.028>
27. ncbi. No Title listeria. 2021.
  28. Harvey J. J. harvey pirie,. 1940;ix:1940.
  29. Seeliger HPR. Apathogene Listerien: L. Innocua Sp. N. (Seeliger Et Schoofs, 1977). Zentralblatt fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene - Abteilung 1 Originalarbeiten [Internet]. 1981;249(4):487–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0174-3031\(81\)80108-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0174-3031(81)80108-4)
  30. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int J Syst Bacteriol. 1992;42(1):171–4.
  31. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(6):1280–8.
  32. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(9):2210–4.
  33. Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(PART2):526–32.
  34. Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(PART2):641–7.
  35. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(PART 6):1882–9.

36. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(1):286–92.
37. Doijad SP, Poharkar K V., Kale SB, Kerkar S, Kalorey DR, Kurkure N V., et al. *Listeria goaensis* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(10):3285–91.
38. Núñez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerdá J, et al. *Listeria costaricensis* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(3):844–50.
39. Schardt JJ. Characterization of *Listeria* sensu stricto specific genes involved in colonization of the gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. 2018;1–160. Available from: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20180620-1425235-1-2>
40. Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(1):74–81.
41. Quereda JJ, Leclercq A, Moura A, Vales G, Gómez-Martín Á, García-Muñoz Á, et al. *Listeria valentina* sp. Nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(11):5868–79.
42. Carlin CR, Liao J, Weller D, Guo X, Orsi R, Wiedmann M. *Listeria cossartiae* sp. Nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021;71(5).
43. den Bakker HC, Manuel CS, Fortes ED, Wiedmann M, Nightingale KK. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. coloradonensis subsp. nov., isolated from a ranch. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(PART9):3257–68.
44. Korsak D, Krawczyk-Balska A. Identification of the Molecular Mechanism of Trimethoprim Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis.* 2017;14(12):696–700.
45. Tan MF, Siow CC, Dutta A, Mutha NVR, Wee WY, Heydari H, et al. Development



- of ListeriaBase and comparative analysis of *Listeria monocytogenes*. BMC Genomics [Internet]. 2015;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1959-5>
46. Morlay A, Duquenoy A, Piat F, Calemczuk R, Mercey T, Livache T, et al. Label-free immuno-sensors for the fast detection of *Listeria* in food. Meas J Int Meas Confed [Internet]. 2017;98:305–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.measurement.2016.06.038>
  47. Chiara M, Caruso M, D'Erchia AM, Manzari C, Fraccalvieri R, Goffredo E, et al. Comparative genomics of *Listeria* Ssensu Lato: Genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. Genome Biol Evol. 2015;7(8):2154–72.
  48. Stephan R, Althaus D, Kiefer S, Lehner A, Hatz C, Schmutz C, et al. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. Food Control. 2015;57:14–7.
  49. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2016;100(12):5273–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
  50. Liu D. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeriae*. Microbiol Insights. 2013;6:MBI.S10880.
  51. Schardt J, Jones G, Müller-Herbst S, Schauer K, D'Orazio SEF, Fuchs TM. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. Sci Rep. 2017;7(1):1–14.
  52. Kocaman N, Sarimehmetoğlu B. *Listeria monocytogenes* soylarının genetik ve virülens farklılıkları. 2018;89(1):97–107.
  53. Han Q, Song X, Zhang Z, Fu J, Wang X, Malakar PK, et al. Removal of foodborne pathogen biofilms by acidic electrolyzed water. Front Microbiol. 2017;8(JUN):1–

- 12.
54. Raschle S, Stephan R, Stevens MJA, Cernela N, Zurfluh K, Muchaamba F, et al. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. Sci Rep [Internet]. 2021;11(1):9066. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88514-y>
55. Kalekar S, Rodrigues J, Costa DD, Doijad S, Kumar JA. Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from humans in India. 2011;105(5):351–8.
56. Feng Y, Yao H, Chen S, Sun X, Yin Y, Jiao X. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. Front Microbiol. 2020;11(June).
57. Coroneo V, Carraro V, Aissani N, Sanna A, Ruggeri A, Succa S, et al. Detection of Virulence Genes and Growth Potential in *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Ricotta Salata Cheese. J Food Sci. 2016;81(1):M114–20.
58. Ramanjeneya S, Sahoo SC, Pathak R, Kumar M, Vergis J, Malik SVS, et al. Virulence Potential, Biofilm Formation, and Antibiotic Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Cattle Housed in a Particular Gaushala (Cattle Shelter) and Organized Farm. Foodborne Pathog Dis. 2019;16(3):214–20.
59. Scotti M, Han L, Alvarez S, Leclercq A, Moura A, Lecuit M, et al. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in *Listeria*. PLoS Genet. 2018;14(9):1–21.
60. Hof H. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;35(3):199–202.
61. Rolhion N, Cossart P. How the study of *Listeria monocytogenes* has led to new concepts in biology. Future Microbiol. 2017;12(7):621–38.
62. Chlebicz A, Ślizewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(5):1–28.

63. Tekay F. A Case of Neonatal Sepsis due to *Listeria monocytogenes* Serotype 4b: Case report and literature review. Dicle Med J / Dicle Tip Derg. 2014;41(3):599–602.
64. Şahim S, Moğulkoç MN, Kalın R. Satışa Sunulan Etlerde *Listeria monocytogenes* Prevalansı ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 2020;13(3):195–200.
65. Evirgen Ö. *Listeria monocytogenes* İnfeksiyonu ; Kliniği , Tanı ve Tedavi Özellikleri. 2005;12(1):32–5.
66. Dinçer E, Tutar U. *Listeria* Standart Suşlarının Zamana Bağlı Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilim Derg. 2017;38(2).
67. Heidarzadeh S, Dallal MMS, Pourmand MR, Pirjani R, Foroushani AR, Noori M, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, serotyping and virulence genes screening of *Listeria monocytogenes* strains at a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 2018;10(5):307–13.
68. Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. Int J Food Microbiol. 2008;122(3):336–40.
69. Gürel Z, Aslan D. Halk Sağlığı Bakış Açısıyla Gıda Kaynaklı Krizler Ve Önleme Yaklaşımları. Türk Hij Ve Deney Biyol Derg. 2019;76(3):361–76.
70. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>. Listeria.
71. Yousif MG, Al-Shamari AK. Phylogenetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in Iraq. Asian J Pharm Clin Res. 2018;11(2):289–92.
72. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>. Listeriosis.
73. Crandall PG, O'Bryan CA, Peterson R, Dyenson N, Yiannas F. A survey estimating the benefits of incorporating *Listeria* specific growth inhibitors in bulk luncheon meats to be sliced in retail delis. Food Control [Internet]. 2015;53:185–8. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.015>

74. Şahin B, Çetin SA. Gıda Güvenliğinde Risk Faktörleri ve Hijyenin Önemi (Risk Factors and Hygiene Importance in Food Safety). J Tour Gastron Stud. 2017;5(2):310–21.
75. Özbek FŞ, Dan HFİ. 1,2 , 1 1. 2010;24(1):92–100.
76. THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005. In 2005. p. 1–26.
77. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>.
78. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(5):851–75.
79. Eld K, Danielsson-Tham ML, Gunnarsson A, Tham W. Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. Vet Microbiol. 1993;36(1–2):185–9.
80. Hij T, Şenses-Ergül Ş, Sari H, Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretli Y, et al. Araştırma Makalesi/Original Article Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi \* Determination of microbiological characteristics of several kinds of ready-to-eat meals presented for consumption. Den Biyol Derg. 2015;72(3):199–208.
81. Law JWF, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. Front Microbiol. 2015;6(NOV):1–15.
82. Deniz HI, Kiliç Altun S. Şanlıurfa İlinde Tüketime Sunulan Yöresel Peynirlerde Virü lent *Listeria monocytogenes* İzolasyonu ve Identifikasyonu. Atatürk Univ Vet Bilim Derg. 2017;12(3):289–95.

83. Shamloo E, Hosseini H, Moghadam AZ, Larsen HM, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. Iran J Vet Res. 2019;20(4):241–54.
84. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4720–8.
85. Jung YS, Frank JF, Brackett RE, Chen J. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. J Food Prot. 2003;66(2):237–41.
86. Jantzen MM, Navas J, De Paz M, Rodríguez B, Da Silva WP, Nuñez M, et al. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. Lett Appl Microbiol. 2006;43(3):313–7.
87. Huang B, Eglezos S, Heron BA, Smith H, Graham T, Bates J, et al. Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of *Listeria* spp. isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. J Food Prot. 2007;70(8):1874–80.
88. SAĞLAM D, ŞEKER E. Food-borne Bacterial Pathogens. Kocatepe Vet J. 2016;9(2):105–13.
89. Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA J. 2018;16(1).
90. Kurpas M, Wieczorek K, Osek J. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. J Vet Res. 2018;62(1):49–55.
91. Huang L, Hwang CA. In-package pasteurization of ready-to-eat meat and poultry products [Internet]. Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging. Woodhead Publishing Limited; 2012. 437–450 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095718.3.437>

92. Kotzekidou P. Factors influencing microbial safety of ready-to-eat foods [Internet]. Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods. Elsevier Inc.; 2016. 33–50 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00003-0>
93. Amajoud N, Leclercq A, Soriano JM, Bracq-Dieye H, El Maadoudi M, Senhaji NS, et al. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. Food Control. 2018;84:436–41.
94. Halkman AK. *Listeria monocytogenes* ve Listeriosis. List monocytogenes ve List. 2006;38(3):133–40.
95. Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Makino S ichi, et al. Prevalence of listeria monocytogenes in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. J Heal Popul Nutr. 2011;29(1):26–38.
96. Tao T, Chen Q, Bie X, Lu F, Lu Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. Food Control [Internet]. 2017;73:704–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.026>
97. Vongkamjan K, Fuangpaiboon J, Turner MP, Vuddhakul V. Various ready-To-eat products from retail stores linked to occurrence of diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. J Food Prot. 2016;79(2):239–45.
98. Luchansky JB, Chen Y, Porto-Fett ACS, Pouillot R, Shoyer BA, Johnson-Derycke R, et al. Survey for *Listeria monocytogenes* in and on ready-to-eat foods from retail establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing potential changes of pathogen prevalence and levels in a decade. J Food Prot. 2017;80(6):903–21.
99. Selvaganapathi R, Jeyasekaran G, Shakila RJ, Sukumar D, Kumar MP, Sivaraman B. Occurrence of *Listeria monocytogenes* on the seafood contact surfaces of Tuticorin Coast of India. J Food Sci Technol [Internet]. 2018;55(7):2808–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3230-y>

100. Coradini MGL, Maia DSV, Iglesias MA, Haubert L, Lopes GV, da Silva DAL, et al. Occurrence and characterization of *Listeria monocytogenes* from beef jerky processing line. J Food Sci Technol. 2019;56(1):436–42.
101. Bruvoll A. Characterization of the biofilm forming ability of *Listeria monocytogenes* and evaluation of the TTC assay as a method to assess the effect of disinfectants on biofilm bacteria. 78. 2017;
102. Akkaya L. Afyonkarahisar’da Tüketime Sunulan Peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 2006;17(1):87–91.
103. Özkaya K, Yildirim Y. Kayseri’de Satışa Sunulan Çiğ Süt Numunelerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Klasik Kültür Yöntemi ile Belirlenmesi. Kocatepe Vet J. 2010;3(2):25–9.
104. Gokmen M, Akkaya L, Kara R, Onen A. Prevalence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in some ready to eat foods sold retail in Balıkesir. Van Vet J. 2016;27(1):31–6.
105. Kılıç Altun S. Keçi Sütlerinde *Listeria* Spp. Prevalansı Ve Virülen *Listeria monocytogenes*’ in RealTime Pcr İle Belirlenmesi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 2017;2(1):41–6.
106. Şanlıbaba P, Tezel BU, Çakmak GA. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey. J Food Qual. 2018;2018.
107. Kilic Altun S, Atasever M. Investigation of Some Pathogenic Bacteria of Chicken Meat Presented for Sale in. Manas J Agric Vet Life Sci. 2018;8(1):36–50.
108. ŞANLIBABA P, UYMAZ TEZEL B, ÇAKMAK GA. Detection of *Listeria* Spp. in Raw Milk and Dairy Products Retailed in Ankara. Gıda / J Food. 2018;43:273–82.
109. Gülgör G, Korukluoğlu M. Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg. 2014;28(2):83–92.

110. Su X, Cao G, Zhang J, Pan H, Zhang D, Kuang D, et al. Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. Gut Pathog [Internet]. 2019;11(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0307-8>
111. Phelps CC, Vadia S, Arnett E, Tan Y, Zhang X, Pathak-Sharma S, et al. Relative roles of Listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells. Infect Immun. 2018;86(10).
112. Vazquez-Armenta FJ, Hernandez-Oñate MA, Martinez-Tellez MA, Lopez-Zavala AA, Gonzalez-Aguilar GA, Gutierrez-Pacheco MM, et al. Quercetin repressed the stress response factor (*sigB*) and virulence genes (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. Food Microbiol [Internet]. 2020;87(October 2019):103377. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103377>
113. Harb O, Elbab G, Shawish R, Mousa W, Abdeen E. Genetic Detection of *Listeria monocytogenes* Recovered from Fillet Fish Samples. Alexandria J Vet Sci. 2020;67(1):74.
114. Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2018;16(1):32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
115. Choe JE, Welch MD. Actin-based motility of bacterial pathogens: Mechanistic diversity and its impact on virulence. Pathog Dis. 2016;74(8):1–10.
116. Weddle E, Agaisse H. Principles of intracellular bacterial pathogen spread from cell to cell. PLoS Pathog. 2018;14(12):1–8.
117. Costa AC, Pinheiro J, Reis SA, Cabanes D, Sousa S. *Listeria monocytogenes* interferes with host cell mitosis through its virulence factors InlC and ActA. Toxins (Basel). 2020;12(6).
118. Pournajaf A, Rajabnia R, Sedighi M, Kassani A, Moqarabzadeh V, Lotfollahi L, et al. Prevalence, and virulence determination of *Listeria monocytogenes* strains



- isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex polymerase chain reaction. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(5):624–7.
119. Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori MA, Villiers V, Colland F, et al. The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I $\kappa$ B kinase subunit IKK $\alpha$ . Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(40):17333–8.
  120. Gaballa A, Guariglia-oropeza V, Wiedmann M, Boor J. Facilitates Transitions between Extra- and Intracellular Environments. 2019;83(4):1–25.
  121. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):167–93.
  122. Akçelik N, Akçelik M. Bakteriyel Biyofilmler ve Konakçı Savunma Sistemi ile Etkileşimleri Ankara Üniversitesi , Fen Fakültesi , Biyoloji Bölümü Bacterial Biofilms and Their Interactions With The Host Defence System. Erciyes Univ J Nat Appl Sci. 2017;33(1):15–28.
  123. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. Apmis. 2017;125(4):272–5.
  124. Zobell CE. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity1. J Bacteriol. 1943;46(1):39–56.
  125. Dunne WM. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):155–66.
  126. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endod Top. 2010;22(1):2–16.
  127. Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ. Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. Bacteriol Rev. 1974;38(1):87–110.
  128. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am. 1978;238(1):86–95.

129. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* (80- ). 1999;284(5418):1318–22.
130. Pamp SJ, Gjermansen M, Tolker-nielsen T. The Biofilm Matrix—A Sticky Framework. *Horiz Biosci*. 2007;(January 2014).
131. Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol*. 2000;40(2):75–84.
132. Tolker-nielsen TIM. *Bio fi lm Development*. 2015;1–12.
133. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522–54.
134. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006;64(4):313–25.
135. Paula AJ, Hwang G, Koo H. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15165-4>
136. Rana S, Upadhyay LSB. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;157:577–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084>
137. Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol*. 2006;188(23):8213–21.
138. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(9):623–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>
139. Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*.

2010;76(7):2271–9.

140. Ibáñez de Aldecoa AL, Zafra O, González-Pastor JE. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL):1–19.
141. Gloag ES, Fabbri S, Wozniak DJ, Stoodley P. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm.* 2020;2(December 2019).
142. Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm Matrix Proteins. *Microb Biofilms.* 2015;3(2):201–22.
143. Kaplan JB. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J Dent Res.* 2010;89(3):205–18.
144. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012;10(1):39–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2695>
145. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biolims. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:1–11.
146. Saraçlı MA. “Quorum sensing”: Mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gulhane Med J.* 2006;48(4):244–50.
147. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):1–25.
148. Lixa C, Mujo A, Anobom CD, Pinheiro AS. A structural perspective on the mechanisms of. 2015;87:2189–203.
149. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(9):576–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
150. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front Microbiol.*

2019;10(JUN).

151. Miller MB, Bassler BL. Ensing in. 2001;
152. Davis CA, Pyrak-Nolte LJ, Atekwana EA, Werkema DD, Haugen ME. Acoustic and electrical property changes due to microbial growth and biofilm formation in porous media. J Geophys Res. 2010;115.
153. Unosson E. Antibacterial Strategies for Titanium Biomaterials [Internet]. Doctor of Philosophy Thesis, Uppsala Universitet. 2015. 72 p. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/277833092\\_Antibacterial\\_Strategies\\_for\\_Titanium\\_Biomaterials](https://www.researchgate.net/publication/277833092_Antibacterial_Strategies_for_Titanium_Biomaterials)
154. Gün İ, Ekinçi FY. Biyofilmler :Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam Biofilms : Microbial Life on Surfaces. 2009;34:165–73.
155. Kam Hepdeniz Ö, Seçkin Ö. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: Oral biyofilm. SDÜ Sağlık Bilim Derg. 2017;
156. FAO/WHO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. FAO/WHO Microbiol Risk Assess Ser [Internet]. 2004;4:1–48. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42875/1/9241562625.pdf?ua=1>
157. Somers EB, Lee Wong AC. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. J Food Prot. 2004;67(10):2218–29.
158. Brooks JD, Flint SH. Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. Int J Food Sci Technol. 2008;43(12):2163–76.
159. Sharma R, Tyagi P. Microbial Biofilms in Food Processing. 2020;7(9):1413–7.
160. Battin TJ, Besemer K, Bengtsson MM, Romani AM, Packmann AI. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. Nat Rev Microbiol. 2016;14(4):251–63.
161. Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial biofilms in the

- food industry—a comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(4):1–31.
162. Srey S, Jahid IK, Ha S Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* [Internet]. 2013;31(2):572–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
  163. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(9):563–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
  164. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;15(12):740–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>
  165. Wagner EM, Pracser N, Thalguter S, Fischel K, Rammer N, Pospíšilová L, et al. Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *Int J Food Microbiol*. 2020;328(January).
  166. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2009;20(9):407–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>
  167. Ünal D, Tayfur M. Biyofilm. 1978;(5).
  168. Ünal Turhan E, Erginkaya Z. Bakteriyel Biyofilmlerdeki Antimikrobiyel Direnç Mekanizması. *Akad Gıda*. 2019;17(1):131–9.
  169. Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front Microbiol*. 2018;9(MAY):1–18.
  170. Elhariry HM. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. *Food Microbiol* [Internet].

2011;28(7):1266–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.004>

171. Winkelströter LK, Teixeira FB dos R, Silva EP, Alves VF, De Martinis ECP. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. *Microb Ecol.* 2014;68(1):35–46.
172. Møretrø T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes* : biofilm formation and persistence in food-processing environments . *Biofilms.* 2004;1(2):107–21.
173. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(7):2643–69.
174. Tan SYE, Chew SC, Tan SY, Givskov M, Yang L. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014;26:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.002>
175. Colagiorgi A, Di Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms.* 2016;4(3):22.
176. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7336–42.
177. Freeman DJ, Falkiner FR, Patrick S. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. 1989;872–4.
178. Karaca B, Akcelik N, Akcelik M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. *Biol.* 2013;68(1):1–10.
179. Aslan H, Gülmez D. Üriner Candida İzolatlarının Biyofilm Yapabilme Özelliğinin Üriner Kateter Kullanımı ile İlişkisinin Araştırılması ve Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Durumunun Değişimi \* Investigation of the Correlation Betwe. 2016;50(2):256–65.

180. Sugimoto S, Okuda KI, Miyakawa R, Sato M, Arita-Morioka KI, Chiba A, et al. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(February):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep25889>
181. McCutcheon J, Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. *Chem Geol* [Internet]. 2018;498(August):115–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>
182. Priester JH, Horst AM, Werfhorst LC Van De, Saleta JL, Mertes LAK, Holden PA. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. 2007;68:577–87.
183. Bridier A, Sanchez-Vizuet P, Guilbaud M, Piard JC, Naïtali M, Briandet R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol* [Internet]. 2015;45(PB):167–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
184. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front Microbiol*. 2019;10(APR).
185. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials In Vitro. 2023;62(3):915–21.
186. Koban I, Matthes R, Hübner N-O, Welk A, Sietmann R, Lademann J, et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2012;7(1):Doc06.
187. Corte L, Pierantoni DC, Tascini C, Roscini L, Cardinali G. Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms*. 2019;7(3):1–14.
188. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT

- colorimetry. J Antimicrob Chemother. 2005;56(2):331–6.
189. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, et al. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):2612–7.
  190. Sule P, Wadhawan T, Carr NJ, Horne SM, Wolfe AJ, Prüß BM. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. Lett Appl Microbiol. 2009;49(3):299–304.
  191. Bai JR, Wu YP, Elena G, Zhong K, Gao H. Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. RSC Adv. 2019;9(7):3938–45.
  192. Zu R, Yi H, Yi Y, Yong J, Li Y. Effect of Cryptotanshinone on *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation Under In Vitro Conditions. Jundishapur J Microbiol. 2019;12(4).
  193. Rihab BEN SLAMA. Adhesive ability and biofilm metabolic activity of *Listeria monocytogenes* strains before and after cold stress. African J Biotechnol. 2012;11(61):12475–82.
  194. Klancnik A, Raspor P, Bohinc K. Determination of viable biofilm cells in microtiter plates. 2014;(October).
  195. Şahin R, Kaleli İ. Comparison of genotypic and phenotypic characteristics in biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates. Mikrobiyol Bul. 2018;52(2):111–22.
  196. Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. J Biomed Mater Res - Part A. 2006;76(2):425–30.
  197. Yu H, Liu Y, Li L, Guo Y, Xie Y, Cheng Y, et al. Ultrasound-involved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms. Trends Food Sci Technol.



- 2020;96(1800):91–101.
198. Cooray KJ, Fujita M. Detection of Multiple Virulence-Associated Genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in Artificially Contaminated Milk Samples. 1994;4–7.
  199. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FMC. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4130–6.
  200. Bruns S, Seidler M, Albrecht D, Salvenmoser S, Remme N, Hertweck C, et al. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. Proteomics. 2010;10(17):3097–107.
  201. Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. J Fungi. 2017;3(2):1–24.
  202. Words K. Carmen L . de Hoog and Matthias Mann. 2004;
  203. Kojic EM, Darouiche RO. Candida Infections of Medical Devices. Clin Microbiol Rev. 2004;17(2):255–67.
  204. Nett JE, Andes DR. Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. Microb Biofilms. 2015;3(3):33–49.
  205. Kadam SR, den Besten HMW, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. Int J Food Microbiol [Internet]. 2013;165(3):259–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
  206. Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. Novel biocontrol methods for *Listeria monocytogenes* biofilms in food production facilities. Front Microbiol. 2018;9(APR):1–12.
  207. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2003;2(1):22–32.

208. Chin PS, Ang GY, Yu CY, Tan EL, Tee KK, Yin WF, et al. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genetic Diversity of *Listeria* spp. Isolated from Raw Chicken Meat and Chicken-Related Products in Malaysia. *J Food Prot.* 2018;81(2):284–9.
209. Andrea E, Sosa M. Development of *Listeria monocytogenes* biofilms in a CDC biofilm reactor and investigation of effective strategies for biofilm control in food processing environments. 2020;
210. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2950–8.
211. Lunden JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J Food Prot.* 2000;63(9):1204–7.
212. de Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian J Microbiol.* 2010;41(1):97–106.
213. Kyere EO, Foong G, Palmer J, Wargent JJ, Fletcher GC, Flint S. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* in hydroponic and soil grown lettuce leaf extracts on stainless steel coupons. *Lwt [Internet].* 2020;126(January):109114. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109114>
214. Alonso AN, Perry KJ, Regeimbal JM, Regan PM, Higgins DE. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PLoS One.* 2014;9(12):1–16.
215. Todhanakasem T, Young GM. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol.* 2008;190(17):6030–4.
216. Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernandes Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials

- and temperatures. Food Control [Internet]. 2014;35(1):386–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
217. Brauge T, Faille C, Sadovskaya I, Charbit A, Benezech T, Shen Y, et al. The absence of N-acetylglucosamine in wall teichoic acids of *Listeria monocytogenes* modifies biofilm architecture and tolerance to rinsing and cleaning procedures. PLoS One. 2018;13(1):1–19.
  218. Piercey MJ, Hingston PA, Hansen LT. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15°C. Int J Food Microbiol [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>
  219. Gandra TKV, Volcan D, Kroning IS, Marini N, de Oliveira AC, Bastos CP, et al. Expression levels of the agr locus and prfA gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. Int J Food Microbiol [Internet]. 2019;300(April):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.021>
  220. Van Der Veen S, Abee T. HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*. Microbiology. 2010;156(12):3782–90.
  221. Popowska M, Krawczyk-Balska A, Ostrowski R, Desvaux M. InlL from *Listeria monocytogenes* is involved in biofilm formation and adhesion to mucin. Front Microbiol. 2017;8(APR):1–11.
  222. Price R, Jayeola V, Niedermeyer J, Parsons C, Kathariou S. The *Listeria monocytogenes* key virulence determinants hly and prfa are involved in biofilm formation and aggregation but not colonization of fresh produce. Pathogens. 2018;7(1):1–9.
  223. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. Front Microbiol. 2016;7(OCT):1–21.

224. Manios SG, Skandamis PN. Control of *Listeria monocytogenes* in the processing environment by understanding biofilm formation and resistance to sanitizers. *Methods Mol Biol*. 2014;1157:251–61.
225. Ceyhan N. KLİNİK. Biyofilmlerin Önlenmesi İçin Antibiyofilm Stratejileri. *İnfeksiyon Derg*. 2008;22(4):227–40.
226. Speranza B, Corbo MR. The Impact of Biofilms on Food Spoilage [Internet]. *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd; 2017. 259–282 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00014-5>
227. Oloketuyi SF, Khan F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms—current knowledge and future outlooks. *J Basic Microbiol*. 2017;57(9):728–43.
228. Aryal M, Pranatharthiharan P, Muriana PM. Optimization of a microplate assay for generating *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* O157:H7, and *Salmonella* biofilms and enzymatic recovery for enumeration. *Foods*. 2019;8(11).
229. Ohshima C, Kanagawa S, Miya S, Nakamura A, Takahashi H, Kuda T. crossm. 2019;(April):1–2.
230. Beltrame CA, Kubiak GB, Lerin LA, Rottava I, Mossi AJ, Oliveira D De, et al. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria : effect of exposure temperature , contact time , and product concentration. 2012;32(2):228–33.
231. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(4):573–83.
232. Marino M, Maifreni M, Baggio A, Innocente N. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Front Microbiol*. 2018;9(AUG):1–12.
233. Pandiselvam R, Subhashini S, Banuu Priya EP, Kothakota A, Ramesh S V., Shahir S. Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone Sci Eng* [Internet]. 2019;41(1):17–34. Available from: <https://doi.org/10.1080/01919512.2018.1490636>

234. Panebianco F, Rubiola S, Chiesa F, Civera T, Di Ciccio PA. Effect of gaseous ozone on *Listeria monocytogenes* planktonic cells and biofilm: An in vitro study. *Foods*. 2021;10(7).
235. Obłak E, Piecuch A, Guz-Regner K, Dworniczek E. Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;350(2):190–8.
236. Jennings MC, Ator LE, Paniak TJ, Minbiole KPC, Wuest WM. Biofilm-eradicating properties of quaternary ammonium amphiphiles: simple mimics of antimicrobial peptides. *Chembiochem*. 2014;15(15):2211–5.
237. Wang W, Zhou X, Suo Y, Deng X, Cheng M, Shi C, et al. Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China. *Food Control*. 2017;73:1068–73.
238. Da Silva PMB, Acosta EJTR, de Rezende Pinto L, Graeff M, Spolidorio DMP, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 2011;54(6):712–7.
239. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Hébraud M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;236(2):241–8.
240. Poimenidou S V., Chrysadaku M, Tzakoniati A, Bikouli VC, Nychas GJ, Skandamis PN. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int J Food Microbiol*. 2016;237:164–71.
241. Skowron K, Hulisz K, Gryń G, Olszewska H, Wiktorczyk N, Paluszak Z. Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *Int Microbiol*. 2018;21(1–2):23–33.
242. Pang X, Wong C, Chung HJ, Yuk HG. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. *Food Control [Internet]*. 2019;98(November 2018):200–8.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.029>

243. Korany AM, Hua Z, Green T, Hanrahan I, El-Shinawy SH, El-Kholy A, et al. Efficacy of ozonated water, chlorine, chlorine dioxide, quaternary ammonium compounds and peroxyacetic acid against *Listeria monocytogenes* biofilm on polystyrene surfaces. *Front Microbiol.* 2018;9(OCT):1–10.
244. Dhowlaghar N, De Abrew Abeysundara P, Nannapaneni R, Schilling MW, Chang S, Cheng WH, et al. Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in catfish mucus extract on four food contact surfaces at 22 and 108c and their reduction by commercial disinfectants. *J Food Prot.* 2018;81(1):59–67.
245. Yuan L, Sadiq FA, Wang N, Yang Z, He G. Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2020;0(0):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809345>
246. Ling N, Forsythe S, Wu Q, Ding Y, Zhang J, Zeng H. Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. *Engineering* [Internet]. 2020;6(4):393–405. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.007>
247. Torlak E, Sert D. Combined effect of benzalkonium chloride and ultrasound against *Listeria monocytogenes* biofilm on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2013;57(3):220–6.
248. Hamann D, Tonkiel KF, Matthiensen A, Zeni J, Valduga E, Paroul N, et al. Ultrasound use for *Listeria monocytogenes* attached cells removal from industrial brine injection needles. *Ital J Food Sci.* 2018;30(4):662–72.
249. Baumann AR, Martin SE, Feng H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and Ozone. *J Food Prot.* 2009;72(6):1306–9.
250. Wiktorczyk N, Korkus J, Skowron K, Walecka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E. The effect of initial sonication on disinfectant efficacy against

*Listeria monocytogenes* biofilm. Med Res J. 2019;4(2):85–8.

251. Shen H Bin, Chou KC. EzyPred: A top-down approach for predicting enzyme functional classes and subclasses. Biochem Biophys Res Commun. 2007;364(1):53–9.
252. Nahar S, Mizan MFR, Ha AJ won, Ha S Do. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018;17(6):1484–502.
253. Meireles A, Borges A, Giaouris E, Simões M. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. Food Res Int [Internet]. 2016;86:140–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.006>
254. Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. Int J Food Microbiol [Internet]. 2014;187:26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025>
255. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2015;14(4):491–509.
256. Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Fernández L, Martínez B, Rodríguez A, García P. Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. Food Control. 2017;73:1474–82.
257. Montañez-Izquierdo VY, Salas-Vázquez DI, Rodríguez-Jerez JJ. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. Food Control [Internet]. 2012;23(2):470–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.016>
258. Camargo AC, Todorov SD, Chihib NE, Drider D, Nero LA. Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. Mol Biotechnol

- [Internet]. 2018;60(9):712–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-018-0108-1>
259. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm activity as a health issue. *Front Microbiol.* 2016;7(APR):1–14.
260. Aspri M, Field D, Cotter PD, Ross P, Hill C, Papademas P. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *Int Dairy J* [Internet]. 2017;73:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.008>
261. Winkelströter LK, Gomes BC, Thomaz MRS, Souza VM, De Martinis ECP. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* [Internet]. 2011;22(8):1404–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.021>
262. Barceló AM, Cortina IC, Rodríguez AIA, Ballesteros CR. Climatología del Balneario de Villavieja. *An la Real Acad Nac Farm.* 2016;82(5):108–26.
263. Pérez-Ibarreche M, Castellano P, Leclercq A, Vignolo G. Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(12):1–6.
264. Ripolles-Avila C, García-Hernández N, Cervantes-Huamán BH, Mazaheri T, Rodríguez-Jerez JJ. Quantitative and compositional study of monospecies biofilms of spoilage microorganisms in the meat industry and their interaction in the development of multispecies biofilms. *Microorganisms.* 2019;7(12).
265. Gönen K. Gıda Ve Gıda İşletmelerinde *Listeria monocytogenes* Ve Biyofilmine Karşı Kullanılan Bazı Modern Teknikler. *Akad Ve Süt Kurumu Derg.* 2021;(1):19–26.
266. Temiz A. Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar: Ünlütürk A., Turantaş F. (eds). *Gıda Mikrobiyolojisi.* 1. Baskı. İzmir :Mengi tan Basımevi, 1998: 87-107. 2000.
267. Vasanthakrishnan RB, de las Heras A, Scotti M, Deshayes C, Colegrave N,



- Vázquez-Boland JA. PrfA regulation offsets the cost of *Listeria* virulence outside the host. *Environ Microbiol*. 2015;17(11):4566–79.
268. Beasley SS, Saris PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(8):5051–3.
  269. Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F, Andolfi R, Moschetti G. 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *Syst Appl Microbiol*. 2002;25(4):520–7.
  270. Macrina FL, Tobian JA, Jones KR, Evans RP, Clewell DB. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*. 1982;19(3):345–53.
  271. Soni, D. K., & Dubey, S. K. Molecular biology reports, 41(12) 8219-8229. Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Mol Biol Rep*. 2014;41(12).
  272. Levin RE. Application of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods : A Review of Methodology Application of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods : A Review. 2007;(March 2013):37–41.
  273. Gilot P, Content J. by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. *Society*. 2002;40(2):698–703.
  274. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40(2):175–9.
  275. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):996–1006.
  276. Giaouris E, Chorianopoulos N, Nychas GJE. Effect of temperature, pH, and water

- activity on biofilm formation by *Salmonella Enterica enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J Food Prot.* 2005;68(10):2149–54.
277. Hossein J, Mohammadjavad P, Chung YL, Won FW. Prevalence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes in ready mayonnaise salads and salad vegetables in Iran. *African J Microbiol Res.* 2013;7(19):1903–6.
  278. Bannenberg JW, Abee T, Zwietering MH, den Besten HMW. Variability in lag duration of *Listeria monocytogenes* strains in half Fraser enrichment broth after stress affects the detection efficacy using the ISO 11290-1 method. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2021;337:108914. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108914>
  279. Gebremedhin EZ, Hirpa G, Borana BM, Sarba EJ, Marami LM, Kelbesa KA, et al. *Listeria* species occurrence and associated factors and antibiogram of *Listeria monocytogenes* in beef at abattoirs, butchers, and restaurants in ambo and holeta in Ethiopia. *Infect Drug Resist.* 2021;14:1493–504.
  280. Konosonoka IH, Jemeljanovs A, Osmane B, Ikauniece D, Gulbe G. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia . *ISRN Vet Sci.* 2012;2012:1–5.
  281. Gyurova E, Krumova-Vulcheva, G., Daskalov H, Gogov Y. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Bulgaria. *J Hyg Eng Des* [Internet]. 2014;7(December):112–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811569>
  282. Gamboa-Marín A, Sonia Buitrago M, Pérez-Pérez K, Marcela Mercado R, Poutou-Piñales R, Carrascal-Camacho A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Rev MVZ Cordoba.* 2012;17(1):2827–33.
  283. Lambertz ST, Nilsson C, Brådenmark A, Sylvén S, Johansson A, Jansson LM, et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden

2010. Int J Food Microbiol [Internet]. 2012;160(1):24–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.010>
284. Aras Z, Ard M. Occurrence and Antibiotic Susceptibility of *Listeria* Species in Turkey Meats. 2015;35(5):669–73.
  285. El-Shenawy M, El-Shenawy M, Mañes J, Soriano JM. *Listeria* spp. in street-vended ready-to-eat foods. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2011;2011.
  286. Sant’Ana AS, Igarashi MC, Landgraf M, Destro MT, Franco BDGM. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. Int J Food Microbiol [Internet]. 2012;155(1–2):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.036>
  287. Jamali H, Thong KL. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. Food Control [Internet]. 2014;44:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.038>
  288. Abdollahzadeh E, Ojagh SM, Hosseini H, Irajian G, Ghaemi EA. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. Lwt [Internet]. 2016;73:205–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.020>
  289. Lakhanpal P, Panda AK, Thakur SD. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods of animal origin from various tourist destinations of Himachal Pradesh, India. J Commun Dis. 2016;48(3):29–32.
  290. Yücel Şengün İ, Kılıç G. Dut Sirkesinin Mikrobiyolojik, Fiziksel, Kimyasal, Antiradikal ve Antimikrobiyal Özellikleri. Akad Gıda. 2018;16(2):168–75.
  291. M. K. Doğal antimikrobiyel bileşiklerin *Listeria monocytogenes* suşları üzerindeki etkisinin araştırılması. 2021.
  292. Peter A, Umeh EU, Azua ET, Obande GA. Prevalence and Antimicrobial

- Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Beef , Pork and Chicken Sold in Makurdi Metropolis. 2016;14(November 2013):1–7.
293. Silva AS, Duarte EAA, Oliveira TASDE. Identification of *Listeria monocytogenes* in cattle meat using biochemical methods and amplification of the hemolysin gene. 2020;92:1–9.
  294. Article O. Original Article Listerial contamination of raw beef and chevon in.
  295. Yücel N, Çitak S, Önder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiol. 2005;22(2–3):241–5.
  296. Şanlıbaba P, Tezel BU, Çakmak GA, Keskin Akçelik M. Occurrence Of *Listeria* spp. And Antibiotic Resistance Profiles Of *Listeria monocytogenes* From Raw Meat At Retail In Turkey. 2020;32:234–50.
  297. Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Nostro A Lo. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp . isolated from raw meat and retail foods. 2010;21:708–13.
  298. Alonso-hernando A, Prieto M, García-fernández C, Alonso-calleja C, Capita R. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. Food Control [Internet]. 2012;23(1):37–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
  299. El-tawab AAA, Homouda SN, El-haw SE. Prevalence and molecular studies on *Listeria monocytogenes* isolated from chicken in El-Gharbia Governorate. 2018;430–42.
  300. Saludes M, Troncoso M, Figueroa G. Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. Food Control [Internet]. 2015;50:331–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.008>
  301. Pal M. Studies on the prevalence , risk factors , public health implications and antibiogram of *Listeria monocytogenes* in sheep meat collected from Municipal

- Abattoir and butcher shops in Ad ... Studies on the Prevalence , Risk Factors , Public Health Implicatio. 2016;(May).
302. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure N V, Rawool DB, Barbuddhe SB. *Listeria* species in bovine raw milk : A large survey of Central India. 2008;19:109–12.
  303. Moshtaghi H, Mohamadpour AALI. Short Communication. 2007;4(1):107–10.
  304. Paper S. The presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples in Mashhad , Iran. 2010;11(4).
  305. Younes AA, Ramadan L. Prevalence Of *Listeria* spp . In Raw Milk in Syria. 2013;
  306. Marnissi B El, Cohen N, El A, Lalami O, Fez HT. Presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and traditional dairy products marketed in the north-central region of Morocco. 2013;(May 2014).
  307. Botsaris G, Nikolaou K, Liapi M, Pipis C. Prevalence Of *Listeria* Spp . And *Listeria monocytogenes* In Cattle Farms In Cyprus Using Bulk Tank Milk Samples. 2016;00.
  308. Seyoum ET, Woldetsadik DA, Mekonen TK, Gezahegn HA, Wondwossen A. Original Article Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. :9–14.
  309. Usman UB, Kwaga JKP, Kabir J, Olonitola OS. Isolation and Antimicrobial Susceptability of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk and Milk Products in Northern Kaduna State , Nigeria. 2016;4(3):46–54.
  310. Gohar S, Abbas G, Sarfraz M, Ali S, Ashraf M, Aslam R, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products Matrix Science Medica ( MSM ). 2017;1(1):10–4.
  311. Aygun O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp . in the raw milk and dairy products in Antakya , Turkey. 2006;17:676–9.
  312. Investigations of *Listeria* Species in Milk and Silage Produced Makale Kodu ( Article Code ): KVFD-2010-1744 Burdur Yöresinde Üretilen Süt ve Silajlarda

- Listeria* Türlerinin Araştırılması. 2010;16:93–7.
313. Durmaz H, Avcı M. The Presence of *Listeria* Species in Corn Silage and Raw Milk Produced in Southeast Region of Turkey Türkiye ' nin Güneydoğu Bölgesi ' nde Üretilen Mısır Silajı ve Çiğ Sütlerde *Listeria* Türlerinin Varlığı. 2015;21(1):41–4.
  314. Dai J, Bai M, Li C, Cui H, Lin L. Advances in the mechanism of different antibacterial strategies based on ultrasound technique for controlling bacterial contamination in food industry. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2020;105(September):211–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.016>
  315. Medeiros M, De Castro VHL, De Alencar Mota ALA, Pereira MG, De Martinis ECP, Perecmanis S, et al. Assessment of Internalin A Gene Sequences and Cell Adhesion and Invasion Capacity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Foods of Animal and Related Origins. Foodborne Pathog Dis. 2021;18(4):243–52.
  316. Moreno LZ, Paixão R, Dirani D, Gobbi S De, Raimundo DC, Sebastiana T, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* Isolated from Swine Slaughterhouses and Meat Markets. 2014;2014.
  317. Momtaz H, Yadollahi S. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. Diagn Pathol [Internet]. 2013;8(1):1. Available from: Diagnostic Pathology
  318. Zadernowska A. Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* , *Listeria innocua* and *Listeria welshimeri* Isolated from Fish and Shrimp Using In Vivo Early Zebrafish Larvae Models and Molecular Study.
  319. Melo FD, Costa UMDA. Detection of virulence genes and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from artisanal cheese produced in the Southern region of Brazil Bacterial isolates. 2021;93:1–9.
  320. Kargar M, Ghasemi A. Role of *Listeria monocytogenes hlyA* gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. Iran J Clin Infect Dis.

2009;4(4):214–8.

321. Zeinali T, Jamshidi A, Rad M, Bassami M. A comparison analysis of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):10152–7.
322. Bubert A, Riebe J, Schnitzler N, Scho A, Goebel W, Schubert P. Isolation of Catalase-Negative *Listeria monocytogenes* Strains from Listeriosis Patients and Their Rapid Identification by Anti-p60 Antibodies and / or PCR. 1997;35(1):179–83.
323. Liu S, Graham JE, Bigelow L, Morse PD, Wilkinson BJ. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(4):1697–705.
324. Gründling A, Burrack LS, Bouwer HGA, Higgins DE. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(33):12318–23.
325. Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol*. 2007;189(12):4418–24.
326. O’Neil HS, Marquis H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect Immun*. 2006;74(12):6675–81.
327. Osman KM, Samir A, Abo-Shama UH, Mohamed EH, Orabi A, Zolnikov T. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0880-7>
328. Bobade S, Warke S, Kalorey D. Virulence Gene Profiling and Serotyping of *Listeria monocytogenes* from Infertility Cases of Women. 2016;6(January):440–9.
329. Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas G, Giaouris E. Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria*

- monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. 2012;2586–95.
330. Article P. Efficacy of Quaternary Ammonium Compounds on Different Conveyor Chips Contaminated with Poultry Rinsate. 1921;15–9.
331. Lee SHI, Barancelli GV, Corassin CH, Rosim RE, Coppa CFSC, de Oliveira CAF. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant. Brazilian J Pharm Sci. 2017;53(3):1–7.
332. Gawande HM, Av D, Shendurse AM, Khodwe NM. Peroxyacetic Acid : A Potent Food Industry Sanitizer Peroxyacetic Acid: A Potent Food Industry Sanitizer. 2013;(March 2019).
333. Hua Z, Korany AM, El-Shinawy SH, Zhu MJ. Comparative Evaluation of Different Sanitizers Against *Listeria monocytogenes* Biofilms on Major Food-Contact Surfaces. Front Microbiol. 2019;10(November):1–8.



## EKLER

### EK 1. TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA KULLANILAN KİMYASALLAR, BESİYERLERİ, KATKILAR, MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

| Besiyeri/Katkı/Kimyasal                              | Firma             | Katalog Numarası      |
|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Brain Heart Infusion Broth                           | MERCK             | 1. 10493.0010         |
| Chromocult <i>Listeria</i> enrichment supplement     | MERCK             | 1.00439.0010          |
| Chromocult <i>Listeria</i> agar selective supplement | MERCK             | 1. 00432.0010         |
| Chromocult <i>Listeria</i> selective agar bare acc.  | MERCK             | 1. 00427. 0500        |
| FRASER <i>Listeria</i> ammonium ion supplemet        | MERCK             | 1.00092. 0010         |
| FRASER <i>Listeria</i> selective enrichment broth    | MERCK             | 1. 10398. 0500        |
| FRASER <i>Listeria</i> selective supplement          | MERCK             | 1. 00093. 0010        |
| LB Broth base                                        | THERMO SCIENTIFIC | 12780052              |
| PALCAM <i>Listeria</i> selective agar base           | MERCK             | 1. 11755. 0500        |
| PALCAM <i>Listeria</i> selective supplement          | MERCK             | 1. 12122. 0001        |
| Tryptone Soya Yeast Extract Agar                     | SIGMA ALDRICH     | 93395                 |
| Tryptone Soya Yeast Extract Broth                    | SIGMA ALDRICH     | 55309                 |
| Bactident Oxidase                                    | MERCK             | 1. 13300. 0001        |
| Etanol                                               | MERCK             | 1. 00983. 2511        |
| Gliserol                                             | MERCK             | 1. 04092. 2500        |
| Gram boyama seti                                     | MERCK             | 1. 11885. 0001        |
| Hidrojen peroksit                                    | MERCK             | 1. 08597. 2500        |
| SIM Medium                                           | MERCK             | 1. 05470. 0500        |
| 16S Primer (Geri/R)                                  | ELLA BIOTECH      | 6121200641E08-189/212 |

**EK 1. TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA KULLANILAN KİMYASALLAR, BESİYERLERİ, KATKILAR, MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR (DEVAMI)**

| <b>Besiyeri/Katkı/Kimyasal</b>       | <b>Firma</b>      | <b>Katalog Numarası</b> |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 16S Primer (İleri/F)                 | ELLA BIOTECH      | 6121200641E07-188/212   |
| Agaroz                               | NZYTECH           | MB14402                 |
| 6X DNA Loading Dye                   | THERMO SCIENTIFIC | R0611                   |
| dNTP                                 | THERMO SCIENTIFIC | 359866                  |
| EDTA                                 | SIGMA ALDRICH     | E51134-500G             |
| Gene Ruler 1 kb DNA Ladder           | THERMO SCIENTIFIC | 350148                  |
| GeneJet Genomic DNA Purification Kit | THERMO SCIENTIFIC | K0722                   |
| İzopropanal                          | MERCK             | 1.00993.1000            |
| Kloroform                            | MERCK             | 1024452500              |
| Lizozim                              | THERMO SCIENTIFIC | 89833                   |
| Taq DNA Polimeraz                    | THERMO SCIENTIFIC | 346217                  |
| TBE Buffer                           | THERMO SCIENTIFIC | B52                     |
| Tris Hidroklorür                     | SIGMA ALDRICH     | T5941-500G              |
| Triton X-100                         | MERCK             | 1086432500              |
| Sodium Dodesil Sulfate (SDS)         | SIGMA ALDRICH     | 8.17034.1000            |
| PAA                                  | BELKIM KIMYA      |                         |
| QAC                                  | BELKIM KIMYA      |                         |

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Hacer Aslan Canberi

**Adres:** Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü,  
Gölbaşı/ANKARA

## EĞİTİM

|                                                              |                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Lisans<br/>(2006-2011)</b>                                | Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü<br>(Not Ortalaması 2.46/4.00)                     |
| <b>Yüksek Lisans<br/>(2012-2015)</b>                         | Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik<br>Mikrobiyoloji A.B.D (Not ortalaması: 3.13/4.00)          |
| <b>Doktora<br/>(2016-Devam)</b>                              | Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Temel<br>Biyoteknoloji Programı (Not ortalaması: 3.88/4.00) |
| <b>Lisans (İkinci Üniversite<br/>Programı) (2012- Devam)</b> | Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Felsefe                                                      |

## YÜKSEK LİSANS TEZİ:

“*Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi”, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı. (2015). Danışman: Prof. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç. YÖK Tez No 420119; 96 sayfa.

## YAYINLAR

### Uluslararası/ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Aslan, H.,** Gulmez D. (2016). “Investigation of the Correlation Between Biofilm Forming Ability of Urinary *Candida* Isolates with the Use of Urinary Catheters and Change of Antifungal Susceptibility in the Presence of Biofilm”. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 50(2), 256-265.
2. **Aslan Canberi, H.,** Şentürk, E., Aktop, S., Şanlıbaba, P. (2020). “Determination of Antimicrobial Activity of Different Essential Oils Obtained from Plants on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Foods”, *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*, 8(4): 1012–1017, ISSN: 2148–127X. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i4.1012-1017.3368>
3. Aktop, S., **Aslan Canberi, H.,** Şentürk, E., Şanlıbaba, P. (2020). “Antibacterial Activity of Different Essential Oils on *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods”, *The Journal of Food (Gıda)*, 45 (5): 861–871, ISSN: 1300–3070, e-ISSN: 1309–6273. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20072>
4. Şentürk, E., Aktop, S., **Aslan Canberi, H.,** Toprak, Z.T., Şanlıbaba, P. (2021). “Antibacterial Effect of Different Herbal Extracts Against *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Foods”, *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*, 9(8): 1474-1479. ISSN: 2148–127X. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i8.1474-1479.4298>

### Yazılan ulusal kitaplar veya kitaplardaki bölümler

1. Aktop, S., **Canberi, H.A.,** Şentürk, E., Şanlıbaba, P. (2020). “Probiyotik Süt ve Ürünleri”, İçinde: *Probiyotik Yüzyılı*, Ed: Akçelik, M., Şanlıbaba, P., Akçelik, N., Tezel, B. U., Bölüm 10, Gazi Kitabevi, sayfa:323–362, Ankara, ISBN 978–625–7045–67–4

### Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler

1. Aktop, S., Aslan Canberi, H., **Şanlıbaba, P. (2022).** “A New Emerging Technology against Foodborne Pathogens: Cold Atmospheric Plasma”, In Book: *Emerging Technologies in Applied & Environmental Microbiology*, Ed: Shah, M.P., Vyas, B.R.M., Academic Press, Elsevier Inc., BASIM AŞAMASINDA.

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. **Aslan Canberi, H., Şanlıbaba, P. (2020).** “*E. coli* Nissle 1917–history, probiotic affect and medical use”, *3<sup>rd</sup> International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)*, March 19–20, Ankara/Turkey, p:23–28. (SÖZLÜ BİLDİRİ)
2. **Aslan Canberi, H., Şanlıbaba, P. (2021).** “Molecular Identification Methods of *Staphylococcus aureus* Isolated from Foods”, *4th International Congress of Agriculture, Environment and Health*, May 20-22, Aydın/Turkey, p: 58-59. (SÖZLÜ BİLDİRİ)
3. **Aslan Canberi, H., Şanlıbaba, P. (2021).** “Biofilm prevention strategies in the food industry”, *4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021)*, November 24-26, Ankara/Turkey. (SÖZLÜ BİLDİRİ).

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

1. Şentürk, E., **Aslan Canberi, H.**, Aktop, S., Şanlıbaba, P. (2020). “*Bacillus* Suşlarının Probiyotik Potansiyelleri”, *Türkiye 13. Gıda Kongresi*, 21–23 Ekim 2020, Çanakkale. (POSTER BİLDİRİ)
2. Aktop, S., Şentürk, E., **Aslan Canberi, H.**, Şanlıbaba, P. (2020). “*Staphylococcus aureus* Suşlarında Antibiyotik Dirençliliğin Moleküler Doğası”, *Türkiye 13. Gıda Kongresi*, 21–23 Ekim 2020, Çanakkale, (POSTER BİLDİRİ)
3. **Canberi Aslan, H.**, Aktop, S., Şentürk, E., Şanlıbaba, P. (2020). “Gıdalardan İzole Edilen *Listeria monocytogenes* Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi”, *Türkiye 13. Gıda Kongresi*, 21–23 Ekim 2020, Çanakkale, (SÖZLÜ BİLDİRİ)
4. Evren, E., **Canberi Aslan, H.**, Us, E., Karahan, Z.C. (2017). “Endotrakeal aspirat örneklerinde Gram boyama ve kültür sonucu uyumunun değerlendirilmesi”. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya (POSTER SUNUMU)
5. Evren, E., Erdal, S., **Aslan, H.**, Us, E., Karahan, Z.C. (2016). “MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi ile küflerin 24 saat içinde tanımlanması mümkün mü?”, 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya (POSTER SUNUMU)

6. Aslan, H., Kıvanç, D. (2016). “İdrar Yolu Enfeksiyonu Etkeni Olan Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi”, 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul. (POSTER SUNUMU)
7. Çakar, A., Aslan, H., Özkuyumcu, C. (2014). “Otopsi Olgularında Postmortem Olarak Saptanan Mikroorganizmaların Dağılımı”, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara (POSTER SUNUMU).

### **Diğer Etkinlikler**

#### **Evrım Ağacı yazıları (<https://evrimagaci.org/balaenoptera60270/icerikler>)**

- 1) Quorum Algılama (Quorum Sensing): Hücreler, Birbiriyle Nasıl Konuşur? (2.Yazar)
- 2) Biyofilm Nedir? Biyofilm Oluşumu Neden Önemlidir? Biyofilmler Nasıl Keşfedildi ve Bilim İçin Neden Önemli? (Yazar)
- 3) Fırsatçı Enfeksiyon Nedir? Fırsatçı Patojenlerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar Nelerdir? Fırsatçı Enfeksiyonlar Neden ve Nasıl Gelişir? (Yazar)
- 4) Zona (Herpes Zoster) (Yazar)
- 5) Tifolu Mary'nin Hikayesi: 19. Yüzyılın Başında Yaşanan Tifo Salgınındaki En Meşhur Süper Bulaştırıcı! (Yazar)
- 6) Probiyotik Nedir? Sindirim Sistemimize Dost Olan Bakteriler Ne İşe Yarar? (Yazar)
- 7) Robert Koch Kimdir? Bakteriyolojinin Babası Tarafından Geliştirilen Koch Postulatları Neler Söyler? (Yazar)
- 8) Bakteriyografi ve Mikrobiyoloji Sanatı: Bakterilerden Portreler Yapmak... (Yazar)
- 9) Maillard Reaksiyonu: Gıdalarda Aroma Olumu ve Esmerleşme (Yazar)
- 10) Pastörizasyon Nedir, Nasıl Yapılır? Süt Kaynaklı Enfeksiyonları Nasıl Önleyebiliriz? (Yazar)

## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/340952673>

# Determination of Antimicrobial Activity of Different Essential Oils Obtained from Plants on Staphylococcus aureus Strains Isolated from Foods

Article in Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology · April 2020

DOI: 10.24925/turjaf.v8i4.1012-1017.3368

CITATION

1

READS

78

4 authors, including:



Simge Aktop  
Ankara University

14 PUBLICATIONS 31 CITATIONS

SEE PROFILE



Pinar Sanlibaba  
Ankara University

61 PUBLICATIONS 255 CITATIONS

SEE PROFILE





## Determination of Antimicrobial Activity of Different Essential Oils Obtained from Plants on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Foods

Hacer Aslan Canberber<sup>1,a</sup>, Esra Şentürk<sup>2,b</sup>, Simge Aktop<sup>2,c</sup>, Pınar Şanlıbaba<sup>2,d,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Institute, Ankara University, 60<sup>th</sup> Year Settlement, 06110 Dışkapı/Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Ankara University, 50<sup>th</sup> Year Settlement, 06830, Gölbaşı/Ankara, Turkey

\*Corresponding author

| ARTICLE INFO                                                                                                                                                                                                       | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Research Article</p> <p>Received : 08/02/2020<br/>Accepted : 23/03/2020</p> <p>Keywords:<br/><i>Staphylococcus aureus</i>,<br/>Antimicrobial activity<br/>Essential oils<br/>Disc Diffusion Method<br/>Food</p> | <p>Essential oils (EOs) are known for its antimicrobial activity against several pathogenic bacteria. The present work evaluated the antimicrobial activity of 15 different EOs on survival of different strains of different <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from traditional cheeses by disc diffusion method. The most antimicrobial activity on the strains was found as oil thyme oil (mean zone diameter 23.203 mm). Clove oil and black seed oil had the highest antimicrobial activity after thyme oil with average zone diameters of 13.698 mm and 11.267 mm respectively. <i>Hypericum perforatum</i> L. oil (mean zone 6.209 mm), ginger oil (mean zone 6.250 mm) and garlic oil (mean zone 6.267 mm) were the lowest antimicrobial activity. New studies about antimicrobial effect of EOs in vivo conditions are recommended.</p> |

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(4): 1012-1017, 2020

## Bitkilerden Elde Edilen Çeşitli Uçucu Yağların Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşları Üzerindeki Antimikrobiyel Etkinliğinin Belirlenmesi

| MAKALE BİLGİSİ                                                                                                                                                                                                     | ÖZ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 08/02/2020<br/>Kabul : 23/03/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler:<br/><i>Staphylococcus aureus</i><br/>Antimikrobiyel aktivite<br/>Uçucu yağ<br/>Disk difüzyon yöntemi<br/>Gıda</p> | <p>Uçucu yağlar (EO), çeşitli patojenik bakterilere karşı antimikrobiyel aktivitesi ile bilinir. Bu çalışmada, 15 farklı EO'nun geleneksel peynirlerden izole edilmiş olan farklı <i>Staphylococcus aureus</i> suşları üzerine göstermiş olduğu antimikrobiyel aktivite disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyel aktivite gösteren EO, kekik yağı (ortalama zon çapı 23,203 mm) olarak bulunmuştur. Karanfil yağı ve çörekotu yağının ise sırasıyla 13,698 mm ve 11,267 mm'lik ortalama zon çapları ile kekik yağından sonra en yüksek antimikrobiyel aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. Sarı kantaron yağı (ortalama zon 6,209 mm), zencefil yağı (ortalama zon 6,250 mm) ve sarımsak yağı (ortalama zon 6,267 mm) ise çalışmadaki en düşük antimikrobiyel aktivite gösteren yağlardır. EO'ların <i>in vivo</i> koşullarda antimikrobiyel etkisi hakkında yeni çalışmalar önerilmektedir.</p> |

<sup>a</sup> [hacer\\_as87@hotmail.com](mailto:hacer_as87@hotmail.com)  
<sup>c</sup> [simgeaktop@hotmail.com](mailto:simgeaktop@hotmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7312-7852>  
<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6257-7767>

<sup>b</sup> [esra.snturk@gmail.com](mailto:esra.snturk@gmail.com)  
<sup>d</sup> [sanlibab@ankara.edu.tr](mailto:sanlibab@ankara.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5710-6947>  
<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4638-6765>



## Introduction

Essential oils (EOs) are volatile and fragrant compounds produced by plants with oily consistency (Bassole et al., 2012). EOs are mixtures of hydrocarbons and oxygenated hydrocarbons originating from the isoprenoid pathways, mainly composed of monoterpenes and sesquiterpenes (Sharifi-Rad et al., 2017). They are synthesized in plant organs such as flower, stem, fruit, seed and secreted by secretion cells, ducts, and glands (Cicioğlu-Aridoğan et al., 2002; Bassole et al., 2012; Sharifi-Rad et al., 2017; de Aguiar et al., 2018).

Although the EOs obtained from different plants are in the chemical composition and the proportions of the substances in the composition obtained by different methods of extraction, their basic components belong to the same chemical classes as mono and sesquiterpene, aldehyde, ketone, ether and ester, alcohol and hydrocarbons (Sharifi-Rad et al., 2017). For example, thyme and carvacrol are the predominant constituents in thyme oil. The dominant active ingredient of clove essential oil is eugenol; most active substances found in black seed oil are thymokinone and p-sinene (Bulca et al., 2014; Han et al., 2017; Omonjio et al., 2018). Eucalyptus oil, laurel oil and sage oil is the dominant active ingredient 1.8 cineol (dos Santos et al., 2007; Barbosa et al., 2016; Gölükçü et al., 2017). Similarly, rosemary essential oil contains 1.8 cineol and camphor;  $\alpha$  pinene and limonene in cumin oil,  $\alpha$  fenchone and limonene in dill oil;  $\alpha$  pinene and  $\alpha$  fenchone in ginger oil and limonene and  $\alpha$  pinene in pine oil are predominantly active substances (Hussain et al., 2010; Radulescu et al., 2010; Sultan et al., 2005; Demirci et al., 2015).

Although their practical use dates back to hundreds of years, it has only recently been scientifically approved. EOs are often used in cosmetics, medicine and food industry. However, EOs are known to have antimicrobial, antifungal and insecticidal activities (Cicioğlu-Aridoğan et al., 2002). Antimicrobial activity of EOs is depended on the source of plant, concentration of the target microorganism, the composition of the substrate, the production and storage conditions of the food (Faydaoğlu et al., 2013). The mechanism of action of EOs is realized by the ability of phenolic monoterpenes to alter microbial cell permeability, cytoplasmic damage, interfere with cellular energy system and disrupt proton motility. Cytoplasmic membrane damage leads to cell death. (Burt et al., 2004; Li et al., 2011; Calo et al., 2014). Some EOs have been reported to inhibit the growth of microorganisms in food sources and prolong the shelf life of processed foods (Cosentino et al., 1999; Barbosa et al., 2016; Mohammadpour et al., 2012). In recent years, EOs have attracted scientific interest because of their potential as a source of biologically active compounds with antimicrobial and antiviral activities that can replace traditional protectives, antibiotics and pesticides (Cicioğlu-Aridoğan et al., 2002; Herman et al., 2015; de Aguiar et al., 2018).

*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* may cause foodborne outbreaks (Seow et al., 2013; de Aguiar et al., 2018). Although

antibiotic use is required for the treatment of these bacteria, the development of antibiotic resistance is the most important factor in treatment failure (Seow et al., 2013; Sevindik et al., 2017). Concerns about consumers' negative perceptions of chemical preservatives have encouraged the food industry to look for new and reliable alternatives, and natural preservatives have begun to be developed (Güner et al., 2012; Seow et al., 2013; Mohammed et al., 2018; Pehlivan and Sevindik, 2018).

In this way, the objectives of this study were to evaluate the *in vitro* activity of 15 different EOs, by disc diffusion methods, against field isolates of *S. aureus* strains isolated from traditional cheeses in Ankara.

## Materials and Methods

### Essential Oils

In this study, 15 different commercial pure oils (purity  $\geq 98\%$ ) (Balen<sup>TM</sup>, Ankara) were purchased from herbalists was tested. The purity and composition of which was determined by the manufacturer. These EOs were: *Hypericum perforatum* L, Ginger, Garlic, Laurel, Juniper, Cumin, Pine, Eucalyptus, Dill, Rosemary, Mint, Sage, Black seed, Clove and Thyme. All the oils were stored at room temperature in the dark prior to testing.

### Bacterial Isolates

In this study, 85 different *S. aureus* strains isolated from traditional cheeses and the reference strain used in this study (*S. aureus* ATCC6538) were obtained from the culture collection of Food Microbiology Laboratory, Department of Food Engineering, Ankara University, Ankara, Turkey. These strains inoculated on Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma<sup>TM</sup>, Germany) and Brain Heart Infusion (BHI) broth (Merck<sup>TM</sup>, Germany) and incubated at 35°C for 24 h. All of the strains used in this study were stored at -20°C with 30% (v/v) glycerol (Merck<sup>TM</sup>, Germany).

### Preparation of Essential Oils for Testing

A sterile 6 mm diameter white disk (Oxoid Ltd, ES) impregnated with 15  $\mu$ L of pure EO was prepared. The discs were soaked for a night.

### Disc Diffusion Method

As a preliminary step, the antibacterial activity of the EOs was determined by the disk diffusion method. Briefly, steril 90 ml TSA medium was prepared. Meanwhile, from an overnight culture, a suspension of  $1 \times 10^8$  CFU/mL was prepared in sterile saline solution. Ten mL bacterial suspensions were transferred onto TSA medium, mixed with shaker and poured into sterile petri dishes. After ensuring that the media solidified, the discs impregnated with different oils numbered 1 to 15 were placed in the petri dishes and allowed to incubate at 37 °C for 24 hours. Furthermore, the effect of the volatile fraction of every EO was studied with the inverted Petri dish method (de Aguiar et al. 2017). The antibacterial activity was evaluated by measuring in millimeters the diameter of the inhibitory zone. All experiments were conducted in duplicate.

### Statistical Analysis

The results were evaluated by repeated measures ANOVA. The obtained measurements were tested by two-way ANOVA analysis. Post-Hoc (Tukey-HSD) tests were performed for factors that were found to be significant as a result of variance analysis.

### Results and Discussion

In our study, the antimicrobial activity of commercially available pure EOs obtained from 15 different plants on *S. aureus* strains was investigated. Zone measurements were made by taking into account the completely transparent diameter around the disk. Zone formation around the disc is shown in Figure 1. The values comparing the mean measurements of the zone diameters for different types of EOs are shown in Table 1 and the graph of the same results is shown in Figure 2. EOs susceptibility of *S. aureus* strains is also showed in Table 2. Within the scope of the study, the diameters of 15 different EOs were investigated by means of a ruler and averages of parallels were obtained for 86 strains of *S. aureus*.

As a result of the study, significant differences were found in the 95% confidence interval between the activities of EOs. According to the results, the most effective antimicrobial EO was determined as thyme oil (average zone 23.203 mm). The highest antimicrobial activity after thyme oil was found as clove (mean zone 13.698 mm) and black seed oil (mean zone 11.267 mm) respectively. *H. perforatum* oil (mean zone 6.209 mm), ginger oil (mean zone 6.250 mm) and garlic oil (mean zone 6.267 mm) were the lowest antimicrobial activity in the study.

The highest antimicrobial activity was found in thyme oil with a zone diameter of 23.203 mm. According to our results, all strains tested were sensitive to thyme oil. The antimicrobial activity of thyme oil was measured as zone diameter above 20 mm in 47 (54.7%) of 86 *S. aureus* strains and these strains were found to be very sensitive to thyme oil. 35 (40.7%) of the strains were moderately sensitive and zone ranges were 15 mm-20 mm. 4 (4.7%) strains were found to be less sensitive to this oil (9 mm-14 mm zone diameter). Thyme oil is an oil with high antimicrobial activity due to its predominant components, thymol and carvacrole (Bayaz et al., 2014). Carvacrol and thymol breakdown the bacterial cell membrane and causes the cell material to leave the cell (Chaieb et al., 2017). In our studies, the antimicrobial activity of thyme oil was similar to different studies (Çon et al., 1998; Ertürk et al., 2010; Radünz et al., 2019). We found that antimicrobial activity on thyme against *S. aureus* was determined as a zone diameter of 29 mm. In previously both studies (Çon et al., 1998; Ertürk et al., 2010), thyme oil showed activity above 20 mm zone diameter. In this context, the results of this study were consistent with them. Lambert et al. (2001) studied the antimicrobial activity of thymol and carvacrol on *S. aureus* and *P. aureginosa*, and found that the combined use of thymol and carvacrol showed higher antimicrobial activity than when used alone. These results suggest that thyme oil may be the cause of the higher inhibitory effect than a volatile oil containing only one of thymol or carvacrole.

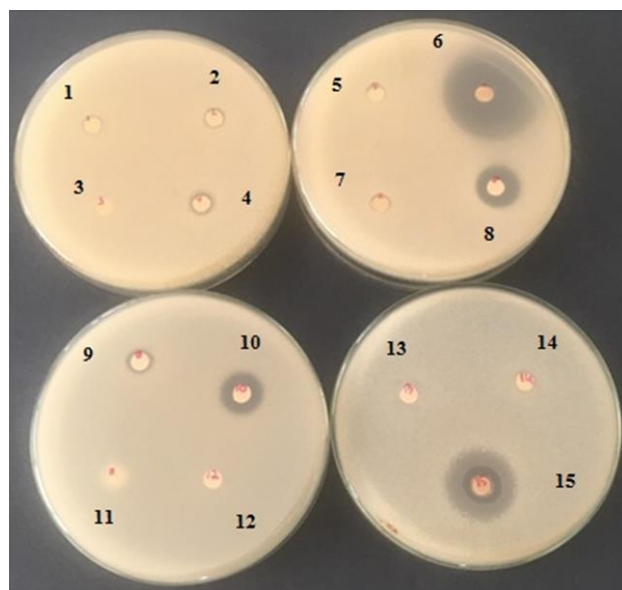


Figure 1. Inhibition zones formed by volatile oils around the disc (*Staphylococcus aureus* ATCC6538)

(Disc 1: eucalyptus oil, disc 2: dill oil, disc 3: juniper oil, disc 4: rosemary oil, disc 5: ginger oil, disc 6: thyme oil, disc 7: *Hypericum perforatum* oil, disc 8: mint oil, disc 9: sage oil, disc 10: clove oil, disc 11: garlic oil, disc 12: pine oil, disc 13: Laurel oil, disc 14: cumin oil, disc 15: black seed oil).

Table 1. Average zone diameters and standard deviation values of Eos\*

| Essential oils              | Mean                | Standard Deviation |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Hypericum perforatum</i> | 6.21 <sup>a</sup>   | 0.65               |
| Ginger                      | 6.25 <sup>a</sup>   | 0.78               |
| Garlic                      | 6.27 <sup>a</sup>   | 0.72               |
| Laurel                      | 6.33 <sup>a,b</sup> | 0.95               |
| Juniper                     | 6.49 <sup>a,b</sup> | 1.31               |
| Cumin                       | 6.51 <sup>b,c</sup> | 1.35               |
| Pine                        | 6.85 <sup>c,d</sup> | 1.72               |
| Eucalyptus                  | 7.08 <sup>d</sup>   | 1.41               |
| Dill                        | 7.52 <sup>e</sup>   | 2.12               |
| Rosemary                    | 8.47 <sup>f</sup>   | 2.15               |
| Mint                        | 8.63 <sup>f</sup>   | 3.23               |
| Sage                        | 9.44 <sup>g</sup>   | 1.61               |
| Black seed                  | 11.27 <sup>h</sup>  | 5.57               |
| Clove                       | 13.7 <sup>i</sup>   | 6.82               |
| Thyme                       | 23.2 <sup>j</sup>   | 8.67               |
| F: 164,709; P: <0.001       |                     |                    |

\*The difference between the mean values of oil types was statistically significant (F=164,709; P<0.001). The smallest significant difference test (LSD: Least Significant Difference) was performed for multiple comparisons to determine the source of the differences. In case of no significant difference between the groups, the mean values were indexed with the same letter.

In our study, clove oil was found to be the most effective oil after thyme oil. The average zone diameter of clove oil was 13.698 mm. While a total of 85 strains were sensitive to clove oil, only one strain had no antimicrobial activity. In this study, 8 (9.3%) strains were very sensitive to clove oil and 20 (23.3%) strains were found to be moderately sensitive 57 (63.3%) strains.

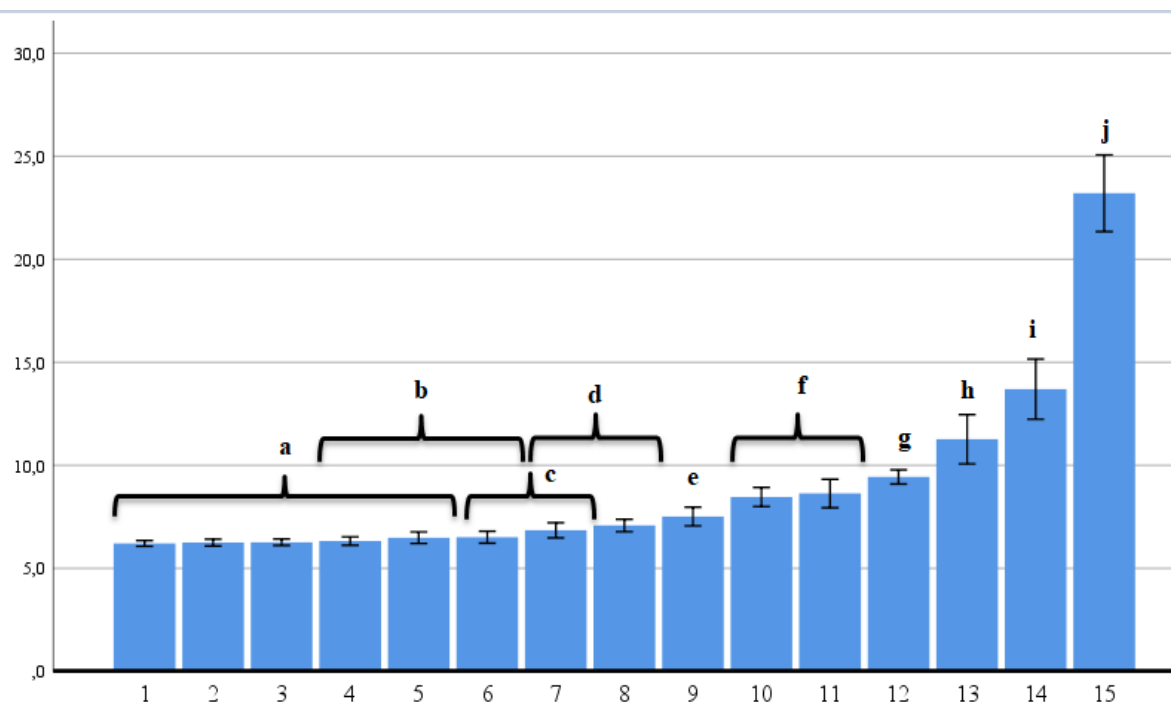


Figure 2. Comparison of measurement diameters of zone diameters for different types of Eos

Table 2. EOs susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains

| Essential Oils              | - <sup>a</sup> |      | + <sup>b</sup> |      | ++ <sup>c</sup> |      | +++ <sup>d</sup> |      |
|-----------------------------|----------------|------|----------------|------|-----------------|------|------------------|------|
|                             | n              | %    | n              | %    | n               | %    | n                | %    |
| <i>Hypericum perforatum</i> | 82             | 95.3 | 4              | 4.7  | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Ginger                      | 81             | 94.2 | 5              | 5.8  | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Garlic                      | 84             | 97.7 | 2              | 2.3  | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Laurel                      | 80             | 93.0 | 6              | 7.0  | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Juniper                     | 78             | 90.7 | 7              | 8.1  | 1               | 1.2  | 0                | 0.0  |
| Cumin                       | 77             | 89.5 | 9              | 10.5 | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Pine                        | 72             | 83.7 | 14             | 16.3 | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Eucalyptus                  | 66             | 76.7 | 20             | 23.3 | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Dill                        | 58             | 67.4 | 28             | 32.6 | 0               | 0.0  | 0                | 0.0  |
| Rosemary                    | 39             | 45.3 | 46             | 53.5 | 1               | 1.2  | 0                | 0.0  |
| Mint                        | 46             | 53.5 | 33             | 38.4 | 7               | 8.1  | 0                | 0.0  |
| Sage                        | 12             | 14.0 | 73             | 84.9 | 1               | 1.2  | 0                | 0.0  |
| Black seed                  | 37             | 43.0 | 22             | 25.6 | 19              | 22.1 | 8                | 9.3  |
| Clove                       | 1              | 1.2  | 57             | 66.3 | 20              | 23.3 | 8                | 9.3  |
| Thyme                       | 0              | 0.0  | 4              | 4.7  | 35              | 40.7 | 47               | 54.7 |

a: ≤8 mm; b: between 8 mm and 14 mm; c: between 14 mm and 20 mm; d: &gt;20 mm

Moreira et al. (2005) in their study of eucalyptus, tea tree, rosemary, mint, rose, clove, lemon, thyme, pine and basil plants obtained from the essential oils of different *E.coli* O157: H17 strains tested on the antimicrobial activity. They found that clove oil was the highest activity oil. Metin et al. (2016) investigated the antimicrobial activity of 100% pure commercial oils of clove, mint and lavender plants against some bacterial fish pathogens. As a result of their study, it was found that clove oil was the highest antimicrobial activity and certain concentrations of the other two oils showed inhibition properties. Antimicrobial activity in cloves has been reported to be due to eugenol in oil structure (Chaieb et al., 2017; Yücel-Şengün et al., 2018). Quattara et al. (1997) found that the most effective essential oils belong to cloves, cinnamon, allspice and rosemary cinnamon, cloves, allspice,

rosemary, black pepper, marjoram, garlic and cumin essential oils of different dilutions were identified against 2 Gram negative and 4 Gram positive bacteria. They stated that the common feature of these oils was eugenol and cinnamaldehyde. Radünz et al. (2019) investigated the antimicrobial efficacy of clove oil on *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* and determined the antimicrobial activity as 28.3 mm, 28.1 mm, 24.7 mm and 22.2 mm, respectively. It was thought that the zone value found for *S.aureus* is considerably higher than the average zone value found in our study. Around the disc, two different zones can be formed: a fully transparent zone and a fuzzy transparent zone. In the evaluation section, only the evaluation of the transparent zone and the evaluation of the total zone formation cannot make the results mathematically different (Radünz et al., 2019).

In our study, the highest activity after black seed oil, oregano and clove oil was determined as the third oil. The average zone value of black seed oil was found to be 11.267 mm. A total of 49 strains were found to be sensitive to black seed oil. In 8 (9.3%) of these strains, values above 20 mm zone diameter were determined and these strains were determined as very sensitive. Nineteen (22.1%) of them were found to be moderately sensitive to black seed oil and 22 (25.6%) were less sensitive. The antimicrobial activity of black seed oil is supported by different studies. Nair et al. (2005), the seed oil of black seed plant on *L. monocytogenes* investigated the antimicrobial activity. In this study, a disc containing impregnated black seed oil and sunflower oil and a disc containing gentamicin were used. They found that the highest antimicrobial activity was shown by black seed oil with an average zone value of 31.5 mm (Nair et al., 2005). It is thought that the difference between the zone value in the study of Nair et al. (2005) and the zone value in our study stems from the difference in microorganism tested. Antimicrobial efficacy of black seed oil has been reported in different studies similar to our study. Thymokinone, the dominant substance found in black seed oil, has been shown to exhibit antimicrobial activity against bacterial strains such as *E. coli*, *S. aureus*, *P. aureginosa* and *B. subtilis* and especially bactericidal activity against gram positive cocci (Khan et al., 2003; Chaieb et al., 2011; Güzelsoy et al., 2018).

Antimicrobial activity of sage, mint and rosemary oils on *S. aureus* strains was also determined in our study. The mean antimicrobial activity of sage oil on *S. aureus* was 9.44 mm, while the mean peppermint oil was 8.63 mm and the mean antimicrobial activity of rosemary oil was also 8.47 mm. While 12 (14%) strains, 46 (53.5%) strains and 39 (45.3%) strains were insensitive to these fats, 73 (84.9%) strains, 33 (38.4%) strains and 46 (53.5%) strains were less sensitive, respectively. Among them, 1 (1.2%) strains, 7 (8.1%) strains and 1 (1.2%) strains were identified as medium susceptible. None of the strains were found in the very sensitive category for all three fats. The results obtained from the study were consistent with the results of different researchers. Moreira et al. (2005), Metin et al. (2016) and Quattara et al. (1997)'s results were in parallel with our results.

In our study, mean zone values of dill, pine, cumin and ginger oils were determined as 7.52 mm, 6.85 mm, 6.51 mm and 6.25 mm respectively. While 58 (67.4%) of the strains were found insensitive to dill oil, 28 (32.6%) were found to be less sensitive. While pine oil was not effective in 72 (83.7%) strains, 9mm-14mm zone diameter was determined on 14 (16.3%) strains. Similarly, while 77 (89.5%) strains were insensitive to cumin oil, the remaining 9 (10.5%) strains were found to be less sensitive (9 mm-14 mm zone diameter). While 81 strains (94.2%) were insensitive to ginger oil, only 5 strains (5.8%) were less sensitive (9 mm-14 mm). According to our results, ginger oil was determined as the lowest antimicrobial activity oil after *H. perforatum* oil. Cumin, dill, ginger and pine oils contain at least one common substance.  $\alpha$ -pinene and limonene in cumin oil,  $\alpha$ -felladren and limonene in dill oil;  $\alpha$ -pinene and  $\alpha$ -felladren in ginger oil and limonene and  $\alpha$ -pinene in pine oil are the predominant active ingredients (Sultan et al., 2005; Hussain et al., 2010; Radulescu et al., 2010; Mohammadpour et al., 2012;

Demirci et al., 2015). Low levels of antimicrobial activity suggest that  $\alpha$ -pinene and limonene and felladren alone or in combination have no effect on *S. aureus* strains.

In our study, the lowest antimicrobial activity oils were *H. perforatum* (average zone diameter: 6.21 mm), ginger (average zone diameter: 6.25 mm), garlic (average zone diameter: 6.27 mm), laurel (average zone diameter 6.33 mm), juniper (average zone diameter 6.49 mm) and cumin (6.51 mm). On a total of 86 *S. aureus* strains, 82 (95.3%), 81 (94.2%), 84 (97.7%), 80 (93.0%), 78 (90.7%) and 77 (89.5%) strains were found insensitive to these five fats. None of the strains had a zone diameter greater than 20 mm. Except for juniper oil (1 strain), no strain was found to be moderately sensitive to these oils. 4 strains (4.7%) were used for *H. perforatum* oil, 5 strains (5.8%) for ginger oil, 2 strains (2.3%) for garlic oil, 6 strains (7.0%) for laurel oil, 7 strains (8.1%) for juniper oil and 9 strains (10.5%) was found to be less sensitive to cumin oil. Our study results differ from other studies. In our study, antimicrobial activity of garlic and cumin oil on *S. aureus* was determined. Quattara et al. (1997) found that antimicrobial activity of garlic and cumin oil. The difference between the two studies is thought to be due to the difference in the bacterial strain tested. Biondi et al. (1993) on the other hand, the dilution of 1/2 of the laurel oil in 1/2, 1/5 and 1/10 dilutions of laurel oil has an antimicrobial effect on *S. aureus* and they do not observe any efficacy in other dilutions. In our study, pure laurel oil had very limited antimicrobial activity on *S. aureus*. In this context, between our results and Biondi et al. (1993)'s result were not compatible. It is thought that this difference may be caused by different varieties and virulence characteristics of the strains even if they are the same species.

## Conclusion

Aromatic plants and the essential oils obtained from these plants have been used for various purposes such as the treatment of diseases among the people and preservatives and flavors in the food for centuries. The use of synthetic additives and antimicrobials that have increased with the advancing technology have had many side effects on health and the need to investigate new sources such as the resistance of microorganisms to synthetic antimicrobials. As a result, the use of medicinal and aromatic plants and the essential oils obtained from them has come to the fore again and efforts to improve the use of these products in medicine, cosmetics, agriculture and food have accelerated. The results of the studies on the antibacterial, antifungal, antiviral, insecticide and food protective effects of the essential oils obtained from plants are generally positive. Therefore, an alternative way of using herbal essential oils is thought.

## References

- Barbosa LCA, Filomeno CA, Teixeira RR. 2016. Chemical variability and biological activities of Eucalyptus spp. essential oils. *Molecules*. doi:10.3390/molecules21121671.
- Bassolé IHN, Juliani HR. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial Properties. *Molecules*. 17: 3989-4006; doi:10.3390/molecules17043989.
- Bayaz M. 2014. Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri. *Akademik Gıda*. 12(3): 45-53.

- Biondi D, Cianci P, Gerad C, Giuseppe R. 1993. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 8: 331-337.
- Bulca S. 2014. Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı. *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty*. 11(2): 29 – 36.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223– 253.
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2014. Essential oils as antimicrobials in food systems— a review. *Food Control*.doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040.
- Chaieb K, Kouidh B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2011. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11:29.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar, T, Kahla-Nakb AB, Rouabhia, M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *myrtaceae*): a short review. *Phytotherapy Research*.21: 501–506.
- Cicioğlu Arıdoğan B, Baydafa H., Kay S, Demirci, M, Ozbaşar D, Mumcu E. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacol Research*. 25(6): 860-864.
- Cosentino, S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130–135.
- Çon AH, Ayar A, Gökalep HY. 1998. Bazı baharat uçucu yağlarının bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi. *Gıda*. 23(3): 171-175.
- de Aguiar FC, Solarte AL, Tarradas C, Luque I, Maldonado A, Galán-Relaño A, Huerta B. 2018. Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs. *Microbiology Open*. doi: 10.1002/mbo3.613.
- Demirci F, Bayramiç P, Göger G, Demirci B, Can Başer KHC. 2015. Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*. 2(2): 39-44.
- dos Santos ACA, Lerin LA, de Luccio M, Mossi A., Atti- Sefarini L, Cansiani, RL, Oliveria, JV. 2007. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29(4): 764-770.
- Ertürk R, Çelik C, Kaygusuz R, Aydın H. 2010. Ticari olarak satılan kekik ve nane uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*. 32: 281-286.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. 2013. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 233-265.
- Gölükçü M, Tokgöz H, Turgut DY. 2017. Defne (*Laurus nobilis*) uçucu yağ bileşimi üzerine distilasyon süresinin etkisi. *Food and Health*, 4(1): 37-42.
- Güner A, Atasever M, Aydemir- Atasever M. 2012. Yeni ortaya çıkan ve tekrar önem kazanan gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 18(5): 889-898.
- Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. 2018. Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*. 7(2):118-35.
- Han X, Parker TL. 2017. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. *Pharmaceutical Biology*.55(1): 1619–1622.
- Herman A, Tambo K, Herman A. 2015. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Current Microbiology*. doi: 10.1007/s00284-015-0933-4.
- Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. 2010. *Rosmarinus officinalis* is essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*.41: 1070-1078.
- Khan MAU, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH. 2003. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research*.17: 183– 186.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.
- Li M, Muthaiyan A, O'Bryan C, Gustafson JE., Li Y. 2011. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.12: 1240-1254.
- Metin S, Didinen BI, Mercimek EB, Ersoy AT. 2017. Bazı bakteriyel balık patojenlerine karşı bazı bitkisel uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesi. *Araştırma Bülteni*. 1: 59-69.
- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT. 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 27(8): 5694-5702.
- Mohammadpour H, Moghimipour E, Rasooli I, Fakoor MH, Astaneh, SA, Moosaie SS, Jalili Z. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil from alborz mountain against *Aspergillus* species. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 7(2):50-55.
- Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 38: 565–570.
- Nai MKM, Vasudevan, P, Venkitanarayanan K. 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*.16:395–398.
- Omonjio FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*. 4: 126-136.
- Quattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 155–162.
- Pehlivan M, Sevindik M. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 6(5): 628-631.
- Radulescu V, Popescu ML, Ilies DC. 2010. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania. *Farmacia*. 58(5).
- Radünz M, Trindade MLM, Camargo TM, Radünz AL, Borges CD, Gandra EA, Helbig E. 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum* L.) oil. *Food Chemistry*.276: 180-186.
- Seow YX, Yeo CR, Chung H, Yuk HG. 2013. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54:625–644.
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z. 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresenius Environ Bull*. 26(7): 4757-4763.
- Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo MR, Ademiluyi AO, Sharifi-Rad R, Ayatollahi SA, Iriti M. 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*. 22(70).
- Sultan M, Bhatti HN, Iqbal Z. 2005. Chemical analyses of essential oil of ginger (*Zingiber officinale*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*.8(11): 1576-1578.
- Yücel Şengün İ, Öztürk B. 2018. Bitkisel kaynaklı bazı doğal antimikrobiyaller. *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*.7(2): 256-276