

Çeşitli gıda örnekleri ve kesimhanelerden izole edilen bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması

Evaluation of biofilm forming ability of some pathogenic bacteria isolated from various food samples and slaughterhouses

ÖZET

Biyofilmler, bakterilere güçlü tolerans ve uygun yaşam ortamları sağlayan, ekstraselüler polimerik maddelere gömülü mikroorganizmalar topluluğudur. Çoğu patojen özellikteki mikroorganizma, uygun koşullar oluştuğunda gıdalarda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturarak gıda endüstrisinde ve halk sağlığı açısından sorunlara yol açmaktadır. Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarla çeşitli gıda örnekleri ve kesimhane ortamından izole edilen ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış, toplam 120 *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* izolatu materyal olarak kullanıldı. Biyofilm oluşumunun kalitatif olarak tespiti amacıyla Kongo Kırmızısı Agar kullanıldı. Yapılan analizler doğrultusunda, toplam 120 izolattan 15'inin (%12,5) kalitatif olarak biyofilm ürettiği tespit edildi. Kalitatif olarak biyofilm oluşturduğu tespit edilen suşların biyofilm oluşturma gücü mikropalak yöntemiyle kantitatif olarak araştırıldı. Mikropalak yöntemine göre 2 *E. faecium* ve 1 *E. faecalis* suşu güçlü biyofilm üreticisi; 2 *L. monocytogenes* (serotip 1/2a) suşu orta düzey biyofilm üreticisi; 4 *E. coli*, 4 *S. aureus* ve 2 *L. monocytogenes* (serotip 1/2a ve serotip 4b) suşu zayıf biyofilm üreticisi olarak belirlendi. *Salmonella* spp. suşlarının tümü biyofilm üretimi açısından negatif olarak belirlendi. Sonuç olarak; süt, mandıra ürünleri, tüketime hazır gıdalar ve kesimhanelerden izole edilen bakterilerde biyofilm üretiminin hem halk sağlığı hem de gıda işletmeleri için önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gıda işleme tesislerinde, üretim hattı boyunca temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinde HACCP, İyi Üretim Uygulamaları gibi gıda sanitasyon sistemlerine riayet edilmesinin biyofilm oluşumunun önüne geçilmesinde faydalı olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, gıda, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Biofilms are ensemble of microorganisms embedded in extracellular polymeric substances that providing bacteria strong tolerance and suitable habitats. In this study, a total of 120 *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* isolates, which were isolated from various food samples and slaughterhouse environment and identified by molecular methods, were used as material. Congo Red Agar was used for the qualitative detection of biofilm formation. According to results, it was determined that 15 (12,5%) out of 120 isolates produced biofilm qualitatively. Biofilm forming levels of qualitative biofilm producers were later quantitatively investigated by microplate method. According to the microplate method, 2 *E. faecium* and 1 *E. faecalis* strains are strong biofilm producers; 2 strains of *L. monocytogenes* (serotype 1/2a) are moderate biofilm producers; 4 strains of *E. coli*, 4 *S. aureus* and 2 *L. monocytogenes* (serotype 1/2a and serotype 4b) were determined as weak biofilm producers. All *Salmonella* spp. strains were negative for biofilm production.

How to cite this article

Uyanık, T., Bölükbaş, A., Gücükoğlu, A., Çadirci Ö. (2022). Evaluation of biofilm forming ability of some pathogenic bacteria isolated from various food samples and slaughterhouses. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 7(3), 338-345. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1194207>

Research Article

Tolga Uyanık^{1a}
Ayşegül Bölükbaş^{1b}
Ali Gücükoğlu^{1c}
Özgür Çadirci^{1d}

¹Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

ORCID-

^a[0000-0002-3181-3878](https://orcid.org/0000-0002-3181-3878)

^b[0000-0002-5516-3689](https://orcid.org/0000-0002-5516-3689)

^c[0000-0002-8465-7768](https://orcid.org/0000-0002-8465-7768)

^d[0000-0003-2018-2545](https://orcid.org/0000-0003-2018-2545)

Correspondence

Tolga UYANIK

tolga.uyanik@omu.edu.tr

Article info

Submission: 25-10-2022

Accepted: 13-12-2022

Online First: 26-12-2022

Publication: 31-12-2022

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



As a result; it is thought that biofilm production in bacteria isolated from milk, dairy products, ready-to-eat foods and slaughterhouses is important for both public health and food industry. It is anticipated that, in the cleaning and disinfection of food processing facilities, compliance with food sanitation systems such as HACCP and Good Manufacturing Practices will be beneficial to prevent biofilm formation.

Keywords: Biofilm, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, food, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ
Biyofilmler, bakterilere güçlü tolerans ve uygun yaşam ortamları sağlayan, ekstraselüler polimerik maddelere gömülü mikroorganizmalar topluluğudur. Leeuwenhoek tarafından 1684 yılında ilkel ışık mikroskobu kullanılarak yapılan incelemelerin, dış yüzeylere tutunan sabit mikroorganizmalar fikrini ortaya atarak mikrobiyal biyofilmlerin ilk gözleminin temelini ortaya attığı kabul edilmektedir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, gemi gövdelerinde toplanan deniz kökenli bakterilerin yüzeyde korozyona yol açtığını gözlemlenmiştir (Shi ve Zhu, 2009). Yüzeylerde bakteriyel yapışma, kümelenme ve çoğalma anlamına gelen 'film' terimi, 1930'lu yıllarda mikrobiyolojide yapışan sabit bakterileri serbest haldeki planktonik organizmalardan ayırmak için kullanılmıştır. 1970'li yıllarda yapılan araştırmalarda, enfekte kistik fibroz hastalarından alınan akciğer doku örneklerinde *Pseudomonas aeruginosa* etkeninin ortamdaki yığınlarının gözlemlenmesiyle biyofilm yapısı hakkında detaylı bilgiler edinilmeye başlanmıştır (Høiby, 2017).

Bakterinin hayatta kalması için uygun koşulları sağlayan biyofilmler, bünyesinde çoğunlukla bakteri hücrelerini ve ekstraselüler matrisi içermektedir. Hücrelerin başta ekzopolisakkaritleri olmak üzere, ekstraselüler DNA'sı ve proteinleri, salgılanan ekstraselüler polimerik maddelere gömülü olarak bulunmaktadır. Bazı ortamlarda, biyofilmlerin ekstraselüler polimerik maddelerinde polisakkaritler, proteinler, fosfolipidler, teikoik asit ve nükleik asit gibi ana bileşenlerin yanı

sıra, mineral kristalleri, silt parçacıkları ve kan bileşenleri de bulunmaktadır (Donlan, 2002). Biyofilm toplulukları, bir veya daha fazla bakteri türünü içerebilen tek katmanlı veya üç boyutlu yapılardır. İçerisinde Gram negatif bakterilerin baskın olduğu biyofilmler nötral veya polianyonik özellikteyken, gram pozitif bakterilerin baskın olduğu biyofilmlerde katyonik matrikslerin oluştuğu bildirilmektedir (Costerton vd., 1995). Bu karmaşık biyofilm yapısının önemi ve amacı; oksijen seviyesinin düşmesi, besinlerin tükenmesi, kimyasal ve mekanik dezenfektanların ortamda bulunması gibi bazı olumsuz koşullara karşı bakterileri korumaktır. Ayrıca biyofilmlerin hücreler arası iletişim sinyallerini iletmede de rol oynadığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (De la Fuente-Núñez vd., 2013; Rahman vd., 2021).

Çoğu patojen özellikteki mikroorganizma, uygun koşullar oluştuğunda gıdalarda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturarak gıda endüstrisinde ve halk sağlığı açısından sorunlara yol açmaktadır. Gıda işlendikten sonra geride kalan gıda kalıntıları uzaklaştırılmadığı takdirde, mikroorganizmalar ekipmanların çeşitli yerlerinde üreyebilmekte ve bu mikroorganizmaların bir araya toplanması biyofilm oluşumuna yol açabilmektedir (Fysun vd., 2019). Yüzeylere tutunan ve ortamdan uzaklaştırılmayan biyofilmlerin varlığı patojen mikroorganizmaların kontaminasyonunda rezervuar görevi görmektedir. Herhangi bir çapraz kontaminasyon durumunda, gıdanın mikrobiyel kalitesi etkilenerek hem raf ömrü azalabilmekte ve hem de bu gıdalar hastalıklara neden olabilmektedir (Flemming ve Wingender, 2010).

Gıda üretim hattı zengin besin varlığı nedeniyle mikroorganizmaların büyümesi, gelişmesi ve oldukça karmaşık olan biyofilm oluşumu için kaynak sağlamaktadır. Gıda endüstrisi, hammadde ve işlenmiş ürünün mikrobiyotasına bağlı olarak belirli bir biyofilm oluşturan mikroorganizma yüküne sahiptir. 1966 yılında *Salmonella* spp. tarafından oluşturulan biyofilmlerin gıda kaynaklı ilk bakteriyel biyofilm olarak bildirilmesinin ardından insanlar için patojen olan *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm üreten önemli mikroorganizmalar içerisinde yer aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Gómez vd., 2016; Var ve Sağlam, 2017; Woo ve Ahn, 2013; Zhao vd., 2017). Öte yandan, gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarında biyofilm oluşumu çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (Gürkan vd., 2021; Kankaya vd., 2017). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada 2012 ve 2021 yılları arasında çeşitli gıda örnekleri ve kesimhane ortamından izole ve tanımlanmış 120 izolatın biyofilm üretme yeteneklerinin kalitatif ve kantitatif yöntemlerle ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METHOD

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalardan izole edilen ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış 120 izolat materyal olarak kullanıldı. Suşların tür bazında dağılımları ve izole edildikleri ortamlar Tablo 1'de gösterilmektedir.

Suşların biyofilm oluşturma yetenekleri kalitatif ve kantitatif yöntemlerle araştırıldı. Biyofilm oluşumunun kalitatif olarak tespiti amacıyla Kongo Kırmızısı Agar (Bileşimi; Brain Heart Infusion: 37 g/L, sükröz: 5 g/L, kongo red: 0,8 g/L, Agar-Agar: 15 g/L) kullanıldı. Bu amaçla Tryptic Soy Broth (TSB) içinde 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilen bakteriyel suşlardan, inkübasyonun ardından bir

öze dolusu alınarak Kongo Kırmızısı Agar'a geçiş yapıldı. Daha sonra petripler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından siyah koloni oluşumu biyofilm oluşumu açısından pozitif olarak kabul edilirken, kırmızı-pembe kolonilerin oluşması biyofilm oluşumu açısından negatif olarak değerlendirildi (Freeman vd., 1989).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

| Adet | Bakteri türü | İzole edildiği ortam | Referans |
|------|--|------------------------|-----------------------|
| 30 | <i>Escherichia coli</i> | Tüketime hazır sandviç | (Uyanık, 2022) |
| 30 | <i>Staphylococcus aureus</i> | Süt ve süt ürünleri | (Gücükoğlu vd., 2012) |
| 22 | <i>Salmonella</i> Infantis | Kanathı eti | (Çadırcı vd., 2021) |
| 6 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2a) | Tavuk parça etleri | (Çadırcı vd., 2018) |
| 5 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2a) | Kesimhane zemini | (Çadırcı vd., 2018) |
| 5 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2b) | Bıçak | (Çadırcı vd., 2018) |
| 5 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2b) | Sığır karkası | (Çadırcı vd., 2018) |
| 5 | <i>Salmonella</i> Virchow | Kanathı eti | (Çadırcı vd., 2021) |
| 3 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2a) | Kanathı eti | (Çadırcı vd., 2021) |
| 3 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2c) | Kanathı eti | (Çadırcı vd., 2021) |
| 2 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 4b) | Bıçak bileyicisi | (Çadırcı vd., 2018) |
| 2 | <i>Enterococcus faecium</i> | Süt | (Yayınlanmamış veri) |
| 1 | <i>Enterococcus faecalis</i> | Süt | (Yayınlanmamış veri) |
| 1 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotip 1/2a) | Sığır derisi | (Çadırcı vd., 2018) |

Biyofilm oluşumunun kantitatif olarak tespiti mikropalak yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu amaçla, 96 kuyucuklu polistren plakalar ve BioTek Synergy 4 mikropalak okuyucusu kullanıldı. Stepanović vd. (2007) tarafından önerilen bu yöntemin uygulanmasında bazı modifikasyonlar gerçekleştirildi ve aşağıdaki adımlar izlendi:

- Her suştan 200 µL (kriyoprezerve edilmiş stoklardan) alınarak 10 ml TSB'ye geçildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi
- İnkübasyondan sonra, her TSB'den 200 µL alınarak mikropkaya kuyucuklarına aktarıldı ve mikropkalar 37 °C'de 48 saat inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı. Her kuyucuk, non-adherent hücreleri uzaklaştırmak için 300 µL PBS ile üç kez yıkandı
- Daha sonra oluşan biyofilmlerin fiksasyonu için mikropkalar 60 °C'de 1 saat inkübe edildi
- Yapışkan biyofilm tabakası 150 µL %2'lik kristal viyole ile oda sıcaklığında 15 dakika boyama işlemine tabi tutuldu. İnkübasyondan ardından, kuyucuklar PBS ile yıkandı
- Her kuyucuğa 150 µL %95'lik etanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi
- Her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD), BioTek Synergy 4 mikropkaya okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

Çalışmada sadece TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Cutoff OD değeri (OD_c), negatif kontrolün ortalama değeri olarak belirlendi. Buna göre biyofilm oluşumu;

OD ≤ OD_c = biyofilm negatif

OD_c < OD ≤ 2 × OD_c = zayıf biyofilm üreticisi,

2 × OD_c < OD ≤ 4 × OD_c = orta düzey biyofilm üreticisi,

OD > 4 × OD_c = güçlü biyofilm

üreticisi olarak derecelendirildi.

BULGULAR

Yapılan analizler doğrultusunda, toplam 120 izolattan 15'inin (%12,5) Kongo Red Agar'da siyah üreme göstererek kalitatif olarak biyofilm ürettiği tespit edildi. Mikropkaya yöntemiyle, kalitatif olarak biyofilm üreten suşların biyofilm

üretme derecesi araştırıldı. Buna göre 2 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. faecalis* suşu güçlü biyofilm üreticisi; 2 adet *L. monocytogenes* (serotip 1/2a) suşu orta düzey biyofilm üreticisi; 4 adet *E. coli*, 4 adet *S. aureus* ve 2 adet *L. monocytogenes* (serotip 1/2a ve serotip 4b) suşu zayıf biyofilm üreticisi olarak belirlendi. Kalitatif ve kantitatif olarak biyofilm ürettiği saptanan izolatların OD değerlerini içeren veriler Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Bakteri suşlarının biyofilm üretme dereceleri

| Suş | Optik Dansite (ortalama) | Biyofilm yoğunluğu | Suşun orijini |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| <i>E. faecium</i> | 0,340 | Güçlü | Çiğ süt |
| <i>E. faecium</i> | 0,322 | Güçlü | Çiğ süt |
| <i>E. faecalis</i> | 0,317 | Güçlü | Çiğ süt |
| <i>E. coli</i> | 0,138 | Zayıf | Sandviç |
| <i>E. coli</i> | 0,131 | Zayıf | Sandviç |
| <i>E. coli</i> | 0,140 | Zayıf | Sandviç |
| <i>E. coli</i> | 0,126 | Zayıf | Sandviç |
| <i>S. aureus</i> | 0,115 | Zayıf | Çiğ süt |
| <i>S. aureus</i> | 0,142 | Zayıf | Çiğ süt |
| <i>S. aureus</i> | 0,128 | Zayıf | Beyaz peynir |
| <i>S. aureus</i> | 0,117 | Zayıf | Beyaz peynir |
| <i>L. monocytogenes</i> (4b) | 0,115 | Zayıf | Bıçak bileyicisi |
| <i>L. monocytogenes</i> (1/2a) | 0,119 | Zayıf | Kesimhane zemini |
| <i>L. monocytogenes</i> (1/2a) | 0,211 | Orta | Sığır derisi |
| <i>L. monocytogenes</i> (1/2a) | 0,227 | Orta | Kanatlı eti |
| Negatif kontrol (Sadece TSB) | 0,075 (OD_c değeri) | | |

TARTIŞMA

Bu çalışmada analiz edilen bakteri suşlarının %12,5'inin (15/120) biyofilm ürettiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan *Enterococcus* spp. suşlarının tümünün; *E. coli*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* suşlarının %13,3'ünün (her biri 4/30) çeşitli derecelerde

biyofilm ürettiği saptanmıştır. Buna karşın, *Salmonella* spp. suşlarının tümü biyofilm üretimi açısından negatif olarak belirlenmiştir. Ülkemizde gıda kaynaklı patojenlerin biyofilm üretimlerinin araştırıldığı çalışmalarda; et örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının %50'sinin (Gündoğan ve Ataol, 2012); süt, peynir ve etlerden izole edilen 60 *Enterococcus* spp. izolatının tümünün (Gürkan vd., 2021), çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 8 *Salmonella* spp. ve 6 *L. monocytogenes* suşunun hepsinin biyofilm ürettiği (İset, 2016) belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, literatür taramalarından elde edilen sonuçlar, bu çalışmadan elde edilen verilerle değişkenlik göstermektedir. Bu farklılıkların bakterilerin biyofilm üretiminde rol oynayan sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi parametlerin değişkenliğinden dolayı kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda, gıda kaynaklı *Enterococcus* spp. izolatlarında güçlü biyofilm formasyonunun daha sıklıkla görüldüğünü bildiren çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Barbosa vd., 2010; Diaz vd., 2016; Zarzecka vd., 2022). Öte yandan orta düzey ve zayıf biyofilm üretiminin daha yaygın olduğunu bildiren araştırmacılar da mevcuttur (El-Zamkan ve Mohamed, 2021). Yapılan çalışmalar, *E. faecalis* suşlarında güçlü biyofilm oluşumunun agregasyon substansının (*agg*) varlığı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, sitolizin A negatif suşların zayıf biyofilm üretme olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Zheng vd., 2018). Diğer taraftan, Özkök vd. (2021), *E. faecalis* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesinin *E. faecium*'dan daha yüksek olduğunu ve *esp* geninin biyofilm oluşumuyla ilgili olabileceğini bildirmiştir.

E. coli suşlarının biyofilm üretimini ele alan çalışmalarda, zayıf biyofilm üretiminin *E. coli* suşlarında daha yaygın olduğu göze çarpmaktadır. Tajbakhsh vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada 130 *E. coli* izolatının

%56,25'inin zayıf biyofilm üreticisi olduğu raporlanmıştır. Buna paralel olarak, Flament-Simon vd. (2019) 394 *E. coli* izolatının yalnızca %10'unun güçlü biyofilm üretme yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan, Wang vd. (2016) kanatlı orjinli *E. coli* izolatlarının %25,39'unun güçlü, %31,25'inin orta düzeyde, %28,90'ının zayıf biyofilm oluşturduğunu göstermiş ve izolatların %18,36'sının biyofilm oluşturmadığını bildirmiştir. *fimH*, *pap*, *sfa* ve *afa* genlerinin varlığının güçlü biyofilm üretiminde etkili olduğu ortaya konmuştur. Benzer şekilde, *S. aureus* izolatlarında da zayıf biyofilm üretiminin daha yaygın olduğu bildirilmektedir. Chen vd. (2020), 97 gıda kökenli *S. aureus* izolatından %54,64'ünün zayıf, %14,43 orta düzey ve %3,09'unun güçlü biyofilm ürettiğini saptarken, izolatların %28'inin biyofilm üretme yeteneğinde olmadığını bildirmiştir. Diğer yandan, Thiran vd. (2018) 24 adet mandıra kökenli *S. aureus* izolatından 13'ünün (%54) biyofilm üretmediğini, 11'inin (%45,8) zayıf biyofilm üreticisi olarak sınıflandırıldığını bildirmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının güçlü biyofilm üretme olasılığının daha yüksek olduğu, *icaA* ve *icaD* genlerinin biyofilm oluşumuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Manandhar vd., 2018).

Bu çalışmanın bulgularından farklı olarak, Díez-García vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada kümes kökenli *S. Infantis* ve *S. Virchow* suşlarının zayıf biyofilm üretme yeteneğinde olduğunu bildirmiştir. Öte yandan Cufaoglu vd. (2021), kanatlı eti ve kesimhane kökenli *S. Infantis* suşlarının güçlü biyofilm üretme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ise analiz edilen tüm *Salmonella* spp. izolatları biyofilm üretimi açısından negatif olarak tespit edilmiştir. Açıkalın (2017), *S. Infantis* suşlarının biyofilm oluşturma için uygun şartların 72 saat inkübasyon, sıcaklık 20 °C, pH 6,6 ve tuz konsantrasyonu %0,5 olarak belirlemiştir. pH 4,5'te ve %0,5'in üzerindeki tuz konsantrasyonlarında ise tüm *Salmonella*

serotiplerinin biyofilm oluşturmadağını bildirmiştir. Ek olarak, biyofilm üretimi açısından *Salmonella* serotipleri arasında önemli farklılıkların olması, biyofilm üretim kapasitesinin suşa bağlı olabileceğini göstermektedir (Borges vd., 2018). Gıda kökenli serotipler arasında *S. Agona*, *S. Heidelberg*, *S. Typhi* ve *S. Weltevreden* güçlü biyofilm oluşturuçuları olarak ön plana çıkmaktadır (Akinola vd., 2020; Díez-García vd., 2012).

Literatür taramalarında, *L. monocytogenes* 1/2a serotipinin, serotip 4b'ye göre daha fazla biyofilm ürettiği görülmektedir (Borucki vd., 2003; Kadam vd., 2013; Soni ve Nannapaneni, 2010). Ayrıca serotip 1/2a tarafından üretilen biyofilmlerin, serotip 4b'ye göre daha yüksek dansiteli olduğu bildirilmektedir (Pan vd., 2010). Diğer taraftan; kesimhane, kümes ve gıda orjinli *L. monocytogenes* izolatlarında orta düzey veya zayıf biyofilm formasyonunun çok daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Doijad vd., 2015; Harvey vd., 2007; Moretro vd., 2013; Rodrigues vd., 2010). Bu kapsamda değerlendirildiğinde, bu çalışmadan elde edilen verilerin literatürle uyum içinde olduğu görülmektedir.

SONUÇ

Biyofilm içerisindeki patojen bakteriler gıda kontaminasyonlarının ve klinik enfeksiyonların bir kaynağı olarak görülmektedir. Biyofilm oluşumu sadece genetik temellere dayanan bir süreç olmayıp, aynı zamanda pH, sıcaklık ve besin bileşenleri gibi çevresel faktörlere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu kapsamda, süt, mandıra ürünleri, tüketime hazır gıdalar ve kesimhanelerden izole edilen bakterilerde biyofilm üretiminin hem halk sağlığı hem de gıda işletmeleri için önemli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada analiz edilen bakteri suşlarının %87,5'i biyofilm üretimi açısından negatif olarak tespit edilmiştir ancak

özellikle *E. coli* ve *S. aureus* gibi gıda kaynaklı patojenlerde, karışık bakteri kültürlerinin sinerjik etkilerinin biyofilm üretimini artırabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, gıda işleme tesislerinde, üretim hattı boyunca temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinde HACCP, İyi Üretim Uygulamaları gibi gıda sanitasyon sistemlerine riayet edilmesinin biofilm oluşumunun önüne geçilmesinde faydalı olacağı öngörülmektedir.

AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik kurul onayının gerekmediğini beyan ederiz.

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Bampidis, V. A., & Robinson, P. H. (2006).** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), 175-217. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.12.002.
- Açıklam, D. (2017).** *Salmonella Infantis suşlarının oluşturduğu biyofilm üzerine çevresel ve genetik faktörlerin etkisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Akinola, S. A., Tshimpamba, M. E., Mwanza, M., & Ateba, C. N. (2020).** Biofilm Production Potential of Serovars Isolated from Chickens in North West Province, South Africa. *Polish Journal of Microbiology*, 69(4), 427-439.
- Barbosa, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2010).** Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5), 651-656.
- Borges, K. A., Furian, T. Q., de Souza, S. N., Menezes, R., de Lima, D. A., Fortes, F. B. B., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., & Nascimento, V. P. (2018).** Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 118, 238-241.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003).** Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336-7342.
- Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., Liu, X., Zheng, W., Zheng, Z., & Wang, H. (2020).** Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen*, 9(1), e00946.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745.
- Cufaoglu, G., Acar, B. O., Cengiz, G., Ayaz, N. D., & Goncuoglu, M. (2021). Mono-and Mixed-Species Biofilm Formation by Salmonella Infantis, Salmonella Kentucky, Enterococcus faecium, and Enterococcus faecalis. *Acta Veterinaria Eurasia*, 47(3), 149-154.
- Çadırcı, O., Gucukoglu, A., Gulel, G. T., Gunaydin, E., Uyanik, T., & Kanat, S. (2021). Determination and antibiotic resistance profiles of Salmonella serotypes isolated from poultry meat. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 4251-4261.
- Çadırcı, Ö., Gücükoğlu, A., Terzi, G. T., Uyanik, T., & Alişarlı, M. (2018). The existence of Listeria monocytogenes in a cattle slaughterhouse and identification of serotypes by mPCR. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(3), 305-311.
- De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580-589.
- Diaz, M., Ladero, V., Del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2016). Biofilm-forming capacity in biogenic amine-producing bacteria isolated from dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 7, 591.
- Diez-García, M., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of Salmonella isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31(2), 173-180.
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., & Chakraborty, T. (2015). Biofilm-forming abilities of Listeria monocytogenes serotypes isolated from different sources. *PloS One*, 10(9), e0137046.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.
- El-Zamkan, M. A., & Mohamed, H. M. (2021). Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in Enterococcus species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis. *PloS One*, 16(11), e0259584.
- Flament-Simon, S.-C., Duprilot, M., Mayer, N., García, V., Alonso, M. P., Blanco, J., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2019). Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1183.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Freeman, D., Falkiner, F., & Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.
- Fysun, O., Kern, H., Wilke, B., & Langowski, H.-C. (2019). Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and Bioproducts Processing*, 113, 39-48.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and Escherichia coli O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 863.
- Gücükoğlu, A., Onur Kevenk, T., Uyanik, T., Çadırcı, Ö., Terzi, G., & Alişarlı, M. (2012). Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk and dairy products by multiplex PCR. *Journal of Food Science*, 77(11), M620-M623.
- Gündoğan, N., & Ataol, Ö. (2012). Et örneklerinden izole edilen Staphylococcus aureus ve koagülaz negatif stafilokok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3), 135-142.
- Gürkan, T., Kūlahcı, M. B., & Çıtak, S. (2021). Gıda örneklerinden izole edilen Enterococcus türlerinin çeşitli virülans özellikleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*(28), 924-932.
- Harvey, J., Keenan, K., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by Listeria monocytogenes strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.
- Hoiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272-275.
- İset, Ş. (2016). Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen salmonella ve listeria monocytogenes suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve elektron mikroskopik tekniklerle değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Kadam, S. R., den Besten, H. M., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abec, T. (2013). Diversity assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259-264.
- Kankaya, D. A., Tuncer, B. Ö., & Tuncer, Y. (2017). Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri. *Gıda*, 42(1), 8-19.
- Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S., & Shrivastava, N. (2018). Biofilm producing clinical Staphylococcus aureus isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in tertiary care hospitals of Nepal. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2749.
- Moretro, T., Langsrud, S., & Heir, E. (2013). Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: Characterisation of survival properties of Listeria monocytogenes and the commensal bacterial flora.
- Özkök, Z., Bilgin, K., Tanrıverdi Çaycı, Y., & Birinci, A. (2021). Investigation of biofilm formation of Enterococcus species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 78(3), 363-372.
- Pan, Y., Breidt Jr, F., & Gorski, L. (2010). Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by Listeria monocytogenes

- serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1433-1441.
- Rahman, M. U., Fleming, D. F., Sinha, I., Rumbaugh, K. P., Gordon, V. D., & Christopher, G. F. (2021).** Effect of collagen and EPS components on the viscoelasticity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Soft Matter*, 17(25), 6225-6237.
- Rodrigues, L. B., Santos, L. R. d., Tagliari, V. Z., Rizzo, N. N., Trenhago, G., Oliveira, A. P. d., Goetz, F., & Nascimento, V. P. d. (2010).** Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1082-1085.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009).** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 407-413.
- Soni, K. A., & Nannapaneni, R. (2010).** Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1519-1524.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- Tajbakhsh, E., Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N., & Khamesipour, F. (2016).** Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1), 1-8.
- Thiran, E., Di Ciccio, P., Graber, H., Zanardi, E., Ianieri, A., & Hummerjohann, J. (2018).** Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1000-1012.
- Uyanik, T. (2022).** Samsun ilindeki hastane kantinlerinde satışa sunulan tüketime hazır sandviçlerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* varlığının araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 37-42.
- Var, I., & Sağlam, S. (2017).** Biofilm Structure of foodborne pathogens. *Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs Microbiology Book Series*, 6, 301-307.
- Wang, Y., Yi, L., Wang, Y., Wang, Y., Cai, Y., Zhao, W., & Ding, C. (2016).** Isolation, phylogenetic group, drug resistance, biofilm formation, and adherence genes of *Escherichia coli* from poultry in central China. *Poultry Science*, 95(12), 2895-2901.
- Woo, J., & Ahn, J. (2013).** Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 56(4), 307-313.
- Zarzecka, U., Zadernowska, A., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022).** Effects of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among *Enterococcus* spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiology*, 102, 103900.
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. (2017).** Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58), 36670-36683.
- Zheng, J.-x., Bai, B., Lin, Z.-w., Pu, Z.-y., Yao, W.-m., Chen, Z., Li, D.-y., Deng, X.-b., Deng, Q.-w., & Yu, Z.-j. (2018).** Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *Journal of Medical Microbiology*, 67(1), 60.