

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARIN SÜT ÜRÜNLERİ ENDÜSTRİSİNDE
SORUN TEŞKİL EDEN *GEOBACILLUS* VE *ANOXYBACILLUS*
BİYOFİMLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN VE BİYOGİDERİM
MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

Başar KARACA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2018**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Başar KARACA tarafından hazırlanan “Farklı Çevresel Koşulların Süt Ürünleri Endüstrisinde Sorun Teşkil Eden *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Biyofilmleri Üzerine Olan Etkilerinin ve Biyogiderim Mekanizmalarının Belirlenmesi” adlı tez çalışması 02/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02.02.2018



Başar KARACA

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARIN SÜT ÜRÜNLERİ ENDÜSTRİSİNDE SORUN TEŞKİL EDEN *GEOBACILLUS* VE *ANOXYBACILLUS* BİYOFİMLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN VE BİYOGİDERİM MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Başar KARACA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doçent. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Öncelikle 84 *Anoxybacillus* ve 20 *Geobacillus* cinsi üyesi termofilik basilin genel biyofilm üretim karakteristikleri belirlenmiştir. Ayrıca, bakterilerin tam yağlı süt içeriğindeki biyofilm üretim kapasiteleri saptanmıştır. Tam yağlı sütte birçok *Anoxybacillus* üyesi önemli düzeyde biyofilm üretmiştir. Toplam 104 bakteriden 23'ünün (8 *Geobacillus*, 15 *Anoxybacillus*) tam yağlı süt ortamındaki 316 L tipi paslanmaz çelik yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim miktarları belirlenmiş ve 8 bakteri (4 *Geobacillus*, 4 *Anoxybacillus*) seçilmiştir. Bu 8 bakteride temel çevresel parametrelerin biyofilm fizyolojisi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu etkiler, suş düzeyinde farklılık göstermiş, cins düzeyinde ise özellikle yüksek sıcaklığın (65 °C) ve alkali pH'nın biyofilm üretimini teşvik ettiği görülmüştür. Biyofilm üretiminde sütteki organik bileşenlerin (kazein ve laktoz) belirleyici olmadığı ancak; inorganik bileşenlerden magnezyum ve kalsiyumun önemli olduğu görülmüştür. Tam yağlı sütte bakterilerin 55 °C'de cam gibi yüksek hidrofilik karakteristikte yüzeyleri, 65 °C'de ise görece hidrofilik paslanmaz çelik yüzeyleri biyofilm üretimi için tercih ettiği görülmektedir. Tam yağlı sütün, yarım yağlı ve yağsız süt tiplerine oranla biyofilm üretimini ve sporulasyonu daha çok tetiklediği görülmüştür. *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmlerdeki hücre dışı DNA'nın (eDNA) rolü ilk kez gösterilmiştir. Biyofilmlerin gideriminde, en çok proteinleri degrade eden ajanların etkin olduğu saptanmıştır. Dinamik koşullarda statik koşullara nispeten daha kompozit ve kalın olan biyofilmlerin, en etkin olarak belirlenen ajanlarla giderilebilmesi için sanitasyon müdahalesinin kritik noktalarda yapılması gerektiği anlaşılmıştır. Termofilik basillerin oluşturdukları biyofilm yapıları ve biyofilmlerin yüzeylerden giderim stratejisi sonuçları, CLSM analizleriyle de ortaya konulmuştur. Süt endüstrisinde sorun teşkil eden yeni termofilik basiller tanımlanmış ve termofilik biyofilmler ilk kez bu kadar geniş kapsamda ele alınmıştır.

Şubat 2018, 289 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik basil, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, Biyofilm oluşumu ve giderimi, Süt ürünleri ve endüstrisi, Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopisi (CLSM)

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINING OF THE IMPACTS OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS AND REMOVAL MECHANISMS ON PROBLEMATIC *GEOBACILLUS* AND *ANOXYBACILLUS* BIOFILMS IN DAIRY INDUSTRY

Başar KARACA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

The general biofilm forming characteristics of 84 *Anoxybacillus* and 20 *Geobacillus* were determined. Also, the biofilm producing capacities of these bacteria in whole milk were demonstrated. Most of the members of *Anoxybacillus* produced considerable amount of biofilm in whole milk. The biofilm producing quantities of 23 (8 *Geobacillus*, 15 *Anoxybacillus*) out of 104 bacteria were determined on type 316 L stainless steel surfaces in whole milk and 8 bacteria (4 *Geobacillus*, 4 *Anoxybacillus*) were selected. In these 8 bacteria, the effects of environmental parameters on biofilm physiology were assessed. While these effects differed on the strain level, especially higher temperatures (65 °C) and alkaline pH were shown to promote biofilm production on genus level. While organic components (casein and lactose) of milk were not found to be determinative on biofilm formation, the inorganic components including calcium and magnesium were found to trigger the biofilm formation. In whole milk, bacteria were found to prefer high hydrophilic surfaces such as glass at 55 °C and relatively hydrophilic surfaces such as stainless steel at 65 °C. Compare to semi-skimmed and skimmed milk types, the whole milk was found to promote better biofilm production and sporulation. The role of extracellular DNA (eDNA) in biofilms of *Geobacillus* and *Anoxybacillus* was firstly demonstrated. In biofilm eradication, the sanitation agents degrading proteins were determined to be most effective. The biofilms of bacteria formed under dynamic conditions were more composite and thick and their eradication by using the most effective agents were found to require sanitation treatments at critical points. The structure and removal strategies of biofilms produced by thermophilic bacilli were revealed with CLSM analyses. New thermophilic bacilli that pose problems in milk industry were identified and their biofilms were addressed comprehensively for the first time.

February 2018, 289 pages

Key Words: Thermophilic bacilli, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, Biofilm formation and removal, Milk products and industry, Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini ve kıymetli zamanını hiçbir koşulda benden esirgmeden paylaşan; yalnızca tez danışmanlığına yönelik değil, bu süreçteki her zorlukta sabırla destek veren kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı),

Çok değerli katkılarından dolayı TİK üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ'a (Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), doktora sürecim boyunca gereksinim duyduğum her koşulda akademik tecrübelerini ve güler yüzünü esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektörü), konfokal lazer taramalı mikroskop çalışmalarındaki desteğinden ötürü Uzm. Seda UTKAN'a (Bilkent Üniversitesi, UNAM), gerek tez sürecine gerekse proje çalışmalarına çok önemli katkılarından ötürü Doç. Dr. Sencer BUZRUL'a (Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurumu), sıcak dostluklarını ve tecrübelerini her daim paylaşan Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Ergin ŞAHİN'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), Ayşe Büşra KARAKAYA'ya, Tuğba KILIÇ'a, Pırıl Beste ÖZEL'e Emine DEREBAŞ'a, hiçbir koşulda beni yalnız bırakmayıp, pozitif mizaçlarıyla ve dostluklarıyla bana destek olan Araş. Gör. Ekin DEMİRAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), Araş. Gör. Şeyda FİKİRDEŞİCİ ERGEN'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), Hüseyin Kaan KABADAYI'ya, Deniz ABACI'ya, Buğrahan AÇKALMAZ'a ve adını zikredemediğim tüm dostlarıma,

Sonsuz bir minnetle ve sevgiyle her daim andığım, umudumun tanımı ve yaşam ışığım olan anneme ve ablama,

Bu doktora tezi, 116Z422 kodlu, “Süt Endüstrisinde Termofilik Basillerin Biyofilm Oluşumlarının ve Biyofilm-Spor Giderimlerinin Mikrobiyolojik, Mikroskopik ve Moleküler Biyolojik Tekniklerle İncelenmesi” başlıklı 1001 projesi ile desteklenmiş olup, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK)

Sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Başar KARACA

Ankara, Şubat 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1 Biyofilmin Kısa Tarihçesi, Tanımı, Genel Oluşum Mekanizmaları ve Özellikleri	8
2.1.1 Biyofilmin kısa tarihçesi	8
2.1.2 Biyofilmin tanımı.....	10
2.1.3 Biyofilmin genel oluşum mekanizmaları ve özellikleri	10
2.2 Biyofilm Matriksi	14
2.2.1 Hücre dışı DNA (eDNA)	19
2.3 Termofilik Basillerin Genel Karakteristikleri.....	20
2.3.1 <i>Geobacillus</i> cinsinin karakteristikleri.....	21
2.3.2 <i>Anoxybacillus</i> cinsinin karakteristikleri ve <i>A. flavithermus</i>	22
2.4 Termofilik Basillerin Süt ve Süt Ürünleri Endüstrisindeki Önemi ve Neden Olabilecekleri Riskler	23
2.4.1 Termofilik basillerin neden oldukları gıda bozulmaları	27
2.5 Hijyen İndikatörleri Olarak Termofilik Basiller	28
2.6 Termofilik basillerin endosporları	29
2.6.1 Spor oluşumu	30
2.6.2 Endospor direnci	31
2.6.3 Endosporların vejetasyonu.....	35
2.7 Süt ve Süt Ürünlerinin İşlendiği Süreçlerde Termofilik Biyofilmler	35
2.7.1 Vejetatif hücrelerin ve sporların tutunması	39

2.7.2 Tutunmuş vejetatif hücrelerin ve sporların gelişmesi	40
2.7.3 Biyofilmler içerisindeki sporların gelişimi.....	41
2.8 Süt Kompozisyonunun ve Sütün İşlendiği Çevrelerin Termofilik Biyofilmlerin Gelişimindeki Rolü	42
2.8.1 Organik bileşenlerin etkisi (proteinler ve lipitler)	43
2.8.2 İyonların etkisi.....	46
2.8.3 Süt ve süt ürünlerinin işlendiği yüzeylerin etkisi	48
2.9 Süt İşleme Birimlerinde Termofilik Biyofilmlerin Kontrolü	49
2.10 Biyofilm Çalışmalarında Uygulanan Mikroskopi Temelli Metodlar	53
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	58
3.1 Materyal	58
3.1.1 Bakteri izolatları ve referans suşlar	58
3.1.2 Besiyerleri	65
3.1.3 Çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	66
3.2 Yöntem	71
3.2.1 Bakteri kültürlerinin biyofilm çalışmalarında kullanılmadan önceki ön aktiveleştirme işlemleri.....	71
3.2.2 Biyofilm üretim miktarlarının polistiren mikrotitre plakalarda tayini.....	71
3.2.3 Standart tam yağlı süt içeriğinde biyofilm üretim miktarlarının polistiren mikrotitre plakalarda tayini.....	73
3.2.4 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> cinslerine dahil üyelerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme yeteneklerinin belirlenmesi.....	74
3.2.5 TSB/Standart tam yağlı süt içeriklerinde biyofilm üretim kapasitelerine ve fenotipik karakteristiklerine göre seçilen bakterilerin paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi.....	75
3.2.6 Farklı çevresel parametrelerin (tuzluluk, sıcaklık ve pH) termofilik <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> biyofilmleri üzerine olan etkilerinin araştırılması.....	76
3.2.7 Kompleks biyofilm sistemleri içerisinde <i>Geobacillus/Anoxybacillus</i> cinsi bakterilerin etkileşimlerinin araştırılması	77
3.2.8 Major (kazein-laktoz) ve minör (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) süt bileşenlerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması.....	78
3.2.9 Farklı abiyotik yüzeylerin <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> cinsi üyelerinin süt ortamında biyofilm üretimlerine olan etkilerinin araştırılması.....	79

3.2.10 Farklı yağ içeriğine sahip inek sütlerindeki <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> cinsi üyelerinin biyofilm üretim kapasiteleri ve sporulasyon kinetikleri	80
3.2.11 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T ve <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşlarının statik koşullarda ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında zamana bağlı biyofilm üretim yanıtlarının belirlenmesi.....	81
3.2.12 Termofilik biyofilmlerin karbohidrat içeriklerinin belirlenmesi	82
3.2.13 Termofilik biyofilmlerin protein içeriklerinin belirlenmesi.....	84
3.2.14 Termofilik biyofilmlerin eDNA içeriklerinin belirlenmesi.....	84
3.2.15 eDNA'nın termofilik basillerin gelişmekte olan biyofilmleri üzerindeki yapısal ve fonksiyonel rollerinin araştırılması.....	85
3.2.16 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında tam yağlı süt ihtiva eden ortamlarda geliştirilen termofilik biyofilmlerin çeşitli sanitasyon ajanlarıyla giderimi.....	86
3.2.17 Statik-dinamik koşullarda ve süt ortamında termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerinin karşılaştırılması ve sanitasyon stratejilerinin termofilik biyofilmler üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi	89
3.2.18 <i>A. flavithermus</i> DMS 2641 ^T ve <i>G. thermodenitrificans</i> DMS 465 ^T suşlarının biyofilm üretimleri için en ideal iki abiyotik yüzeyde dinamik koşullarda oluşturduğu biyofilmlere sanitasyon işlemlerinin uygulanması ve CLSM (Konfokal Lazer Mikroskopisi) Analizleri.....	92
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	94
4.1 Tez Çalışmasının Başlangıcındaki Ön Çalışmalar Kapsamında <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> Cinsi İzolatların ve Referans Suşların Biyofilm Üretim Potansiyellerine Göre Taranması.....	94
4.2 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> Cinslerine Üye İzolatların ve Referans Suşların Standart Tam Yağlı Süt Ortamında Biyofilm Üretim Miktarlarının Polistiren Mikrotitre Plakalarda Belirlenmesi.....	105
4.3 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> Cinslerine Dahil Üyelerin Laktozu Fermente ve Kazeini Hidrolize Edebilme Niteliklerinin Belirlenmesi.....	112
4.4 TSB/Standart Tam Yağlı Süt İçeriklerindeki Biyofilm Üretim Kapasitelerine ve Fenotipik Karakteristiklerine (Laktoz Fermentasyonu/Kazein Hidrolizi) Göre Seçilen Bakterilerin Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Biyofilm Üretim Miktarlarının Belirlenmesi	117
4.5 Farklı Çevresel Parametrelerin Termofilik <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> Biyofilmleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması	121

4.5.1 Tuzluluğun termofilik basillerin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişime olan etkileri	121
4.5.2 Sıcaklığın ve pH'nın termofilik basillerin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişime olan etkileri	133
4.6 Kompleks biyofilm sistemleri içerisinde <i>Geobacillus/Anoxybacillus</i> cinsi bakterilerin etkileşimlerinin araştırılması.....	151
4.7 Major (kazein-laktoz) ve minör (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) süt bileşenlerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması.....	153
4.7.1 Kazeinin termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	153
4.7.2 Laktozun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	157
4.7.3 Kalsiyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	160
4.7.4 Potasyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	163
4.7.5 Mazgneyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	166
4.7.6 Sodyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri	169
4.8 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> Üyelerinin Süt Ortamındaki Farklı Abiyotik Yüzeylerde Biyofilm Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi	172
4.9 Farklı yağ içeriğine sahip inek sütlerindeki <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> cinsi üyelerinin biyofilm üretim kapasiteleri ve sporulasyon kinetikleri.....	184
4.10 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T ve <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşlarının standart tam yağlı süt içeriğinde ve statik koşullarda zamana bağlı biyofilm üretim yanıtlarının belirlenmesi	199
4.11 Termofilik biyofilmlerin protein, karbohidrat ve eDNA içeriklerinin belirlenmesi	202
4.12 Tam yağlı süt içeren polistiren mikrotitrasyon plakalarında geliştirilen termofilik biyofilmlerin çeşitli sanitasyon ajanlarıyla giderimi	205
4.13 eDNA'nın termofilik basillerin biyofilmleri üzerindeki yapısal ve fonksiyonel rollerinin araştırılması.....	208
4.14 Statik-dinamik koşullarda ve süt ortamında termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerinin karşılaştırılması	210

4.15 Statik koşullarda ve süt ortamında geliştirilen termofilik biyofilmlerin sanitasyon işlemlerine tabi tutulması.....	211
4.16 <i>A. flavithermus</i> DMS 2641^T ve <i>G. thermodenitrificans</i> DMS 465^T suşlarının biyofilm üretimleri için en ideal iki abiyotik yüzeyde, dinamik koşullarda oluşturduğu biyofilmlere sanitasyon işlemlerinin uygulanması ve CLSM (Konfokal Lazer Mikroskopisi) Analizleri.....	216
5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	227
KAYNAKLAR	258
ZGEMIş.....	287



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Büyüktür
>	Küçüktür
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
3D	Üç boyutlu
Ca ²⁺	Kalsiyum katyonu
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat 5 sulu
dk	Dakika
FeSO ₄	Demir sülfat
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HNO ₃	Nitrik asit
K ⁺	Potasyum katyonu
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
log	Logaritma
mg	Miligram
Mg ²⁺	Magnezyum katyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MnSO ₄	Mangan sülfat
N	Normal
Na ⁺	Sodyum katyonu
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Derece
R	Çap
sn	Saniye
U	Ünite
v	Hacim
V	Volt
w	Ağırlık
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

Kısaltmalar

A.	<i>Anoxybacillus</i>
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	Bovin serum albümini
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CIP	Yerinde temizlik
CLSM	Konfokal lazer mikroskobu
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-karboksamidin
DDAO	9H-(1,3-dikloro-9,9-dimetilakridin-2-7-il
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPA	Dipikolinik asit
DSI	Doğrudan buhar enjeksiyonu
DSM	Alman Kültür Koleksiyonu
eDNA	Hücre dışı DNA
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EPS	Hücre dışı polimerik bileşenler
FISH	Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
FRET	Förster rezonans enerji transferi
G.	<i>Geobacillus</i>
HACCP	Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları
HDPE	Yüksek yoğunluklu polietilen
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kob	Koloni oluşturan birim
L.	<i>Listeria</i>
MALDI-TOF	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MI	Medium I
MLGM	Süt lipit globül membran
OD	Optik dansite
P.	<i>Pseudomonas</i>
PBS	Fosfat tampon
PC	Polikarbonat
PI	Propidyum iyodür
PP	Polipropilen
PTFE	Politetrafloroetilen
PVC	Polivinil klorür
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
RSM	Sulandırılmış süt
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

SF	Serum fizyolojik
sp.	species
STYS	Standart tam yağlı süt
TEPAV	Türkiye Ekonomi Politikaları Araştırma Vakfı
TYS	Tam yağlı süt
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
UHT	Ultra Yüksek Isı
Y.sız	Yağsız
YYs	Yarım yağlı süt



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Stafilokokal bir biyofilmin medikal bir alet üzerinde geliştirdiği biyofilmin TEM mikrografı.....	9
Şekil 2.2 Endüstriyel bir su sistemi içindeki 8 haftalık biyofilmin TEM mikrografı	9
Şekil 2.3 Biyofilm oluşumunun aşamaları ve bu aşamaları gösteren mikrograflar	12
Şekil 2.4 Serbest ve matriksle çevrili mikrokolonilerin elektron mikrografları	18
Şekil 2.5 A. flavithermus'un paslanmaz çelik yüzey üzerindeki 18 saatlik biyofilmi	36
Şekil 2.6 Termofilik biyofilm oluşumu ve biyofilmin yapısı	41
Şekil 2.7 B. subtilis biyofilmlerinin CLSM ve SEM görüntüsü	54
Şekil 2.8 Cam yünü iplikleri üzerinde 28 oC'de, 24 saatlik B. cereus biyofilmlerinin BacLight boyaları ile boyanarak elde edilen CLSM görüntüsü	56
Şekil 3.1 Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması.....	64
Şekil 3.2.a. Çeperlerdeki biyofilm matrikslerine tutunmuş kristal viyole boyası,.....	73
b. Tutunmuş boyanın organik çözücülerle muamele edilmiş hali.....	73
Şekil 3.3.a. 316L tipi paslanmaz çelik kupon (0.8 x 2.5 x 0.1 cm), b. Tam yağlı süt içeren ortama daldırılmış kupon, c. Mekanik olarak (cam boncuklar) parçalanmış biyofilm örneği.....	76
Şekil 3.4.a Polipropilen, b. Polikarbonat, c. Polivinil klorür, d. Polistiren, e. Paslanmaz çelik, f. Cam.....	80
Şekil 3.5 Altılı mikrotitre plaka düzeni. Tam yağlı süt içeren kuyularda çalışılan abiyotik yüzeyler bulunmaktadır	82
Şekil 3.6.a Çalıştırılmaya hazır reaktör, b. Farklı abiyotik yüzeyleri tutan taşıyıcılar	90
Şekil 4.1 <i>Geobacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim karakteristikleri.....	100
Şekil 4.2 <i>Geobacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim miktarlarının histogramları.....	101
Şekil 4.3 <i>Anoxybacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim karakteristikleri.....	103
Şekil 4.4 <i>Anoxybacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim miktarlarının histogramları.....	104

Şekil 4.5 <i>Geobacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim karakteristikleri	110
Şekil 4.6 <i>Geobacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki ve iki farklı sıcaklıktaki biyofilm üretim miktarlarının karşılaştırması	110
Şekil 4.7 <i>Anoxybacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim karakteristikleri	111
Şekil 4.8 <i>Anoxybacillus</i> cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisinde ve iki farklı sıcaklıktaki biyofilm üretim miktarlarının karşılaştırması	112
Şekil 4.9 Seçilen 23 bakterinin paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm üretim kapasiteleri	118
Şekil 4.10 <i>A. caldiproteolyticus</i> A420 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	123
Şekil 4.11 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	124
Şekil 4.12 <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	125
Şekil 4.13 <i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	126
Şekil 4.14 Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyelerinin farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	127
Şekil 4.15 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	128
Şekil 4.16 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	129
Şekil 4.17 <i>G. thermodenitrificans</i> D195 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	130
Şekil 4.18 <i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	131

Şekil 4.19 Tüm <i>Geobacillus</i> üyelerinin farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim miktarları	132
Şekil 4.20 <i>A. caldiproteolyticus</i> A420 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	135
Şekil 4.21 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	137
Şekil 4.22 <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	139
Şekil 4.23 <i>A. tepidamans</i> DSM 16325T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	141
Şekil 4.24 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları	143
Şekil 4.25 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	145
Şekil 4.26 <i>G. thermodenitrificans</i> D195 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	147
Şekil 4.27 <i>G. vulcanii</i> DSM 13174T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları.....	149
Şekil 4.28 Seçilen 8 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> cinslerine üye bakterilerin pH gereksinimlerine göre ideal düzeyde biyofilm üretebildiği koşullar.....	151
Şekil 4.29 Terfomilik basillerin tekli kültürlerinin ve farklı olası kombinasyonlar ile hazırlanan ikili kültürlerin biyofilm ürtiminin belirlenmesi	152
Şekil 4.30 Kazeinin <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	155
Şekil 4.31 Kazeinin <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	156
Şekil 4.32 Laktozun <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	158
Şekil 4.33 Laktozun <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	159
Şekil 4.34 Kalsiyumun <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	161
Şekil 4.35 Kalsiyumun <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	162

Şekil 4.36 Potasyumun <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	164
Şekil 4.37 Potasyumun <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	165
Şekil 4.38 Magnezyumun <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	167
Şekil 4.39 Magnezyumun <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	168
Şekil 4.40 Sodyumun <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	170
Şekil 4.41 Sodyumun <i>Geobacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri.....	171
Şekil 4.42 <i>A. caldiproteolyticus</i> A403 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	173
Şekil 4.43 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	174
Şekil 4.44 <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharadens</i> F81 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	175
Şekil 4.45 <i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T standart suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	176
Şekil 4.46 Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyelerinin standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	177
Şekil 4.47 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	178
Şekil 4.48 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	179
Şekil 4.49 <i>G. thermodenitrificans</i> D195 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	180
Şekil 4.50 <i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	181

Şekil 4.51 Tüm <i>Geobacillus</i> üyelerinin standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	182
Şekil 4.52 <i>A. caldiproteolyticus</i> A403 izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu	187
Şekil 4.53 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu	188
Şekil 4.54 <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu	189
Şekil 4.55 <i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu.....	190
Şekil 4.56 Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu.....	191
Şekil 4.57 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu	192
Şekil 4.58 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri sporulasyonu.....	193
Şekil 4.59 <i>G. thermodenitrificans</i> D195 izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sprulasyonu	194
Şekil 4.60 <i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu	195
Şekil 4.61 Tüm <i>Geobacillus</i> üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu.....	196
Şekil 4.62 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T suşunun standart tam yağlı süt içeriğindeki ve farklı inkübasyon sıcaklık-sürelerdeki sayım sonuçları	200
Şekil 4.63 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T suşunun standart tam yağlı süt içeriğindeki ve farklı inkübasyon sıcaklık-sürelerdeki sayım sonuçları	201
Şekil 4.64.a Termofilik basillerin biyofilm matrikslerindeki total protein içeriği belirlenirken referans alınan protein standardı	203
Şekil 4.64.b Termofilik basillerin biyofilm matrikslerindeki total karbohidrat içeriği belirlenirken referans alınan protein standardı	203
Şekil 4.65 Termofilik basil biyofilm matrikslerindeki toplam karbohidrat ve protein miktarları.....	204

Şekil 4.66 Termofilik basillerin Genomik DNA ve eDNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre molekül ağırlıklarının hesaplanması	205
Şekil 4.67 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları	206
Şekil 4.68 <i>A. kamchatkensis subsp. asaccharedens</i> F81 izolatının biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları	206
Şekil 4.69 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları	207
Şekil 4.70 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları	207
Şekil 4.71 Hücre dışı DNA'nın termofilik biyofilm oluşum başlangıcındaki rolü	209
Şekil 4.72 Hücre dışı DNA'nın olgun termofilik biyofilm yapılarındaki rolü	209
Şekil 4.73 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T suşunun statik ve dinamik koşullardaki biyofilm üretimi	210
Şekil 4.74 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T suşunun statik ve dinamik koşullardaki biyofilm üretimi	211
Şekil 4.75 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi	212
Şekil 4.76 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi	213
Şekil 4.77 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi	214
Şekil 4.78 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi	215
Şekil 4.79 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun farklı inkübasyon sürelerinde, süt ortamında ve dinamik koşullarda geliştirilen biyofilmlerine uygulanan sanitasyon işlemleri ve giderim sonuçları	217

Şekil 4.80 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun farklı inkübasyon sürelerinde, süt ortamında ve dinamik koşullarda geliştirilen biyofilmlerine uygulanan sanitasyon işlemleri ve giderim sonuçları.....	218
Şekil 4.81 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun uygulanan sanitasyon işlemleri sonucunda biyofilmlerinin değişen kalınlıkları.....	219
Şekil 4.82 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun uygulanan sanitasyon işlemleri sonucunda biyofilmlerinin değişen kalınlıkları.....	219
Şekil 4.83 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun paslanmaz çelik yüzeylerde sodyum dodesil sülfat uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri	222
Şekil 4.84 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun polistiren yüzeylerde trikloro asetik asit uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri.....	223
Şekil 4.85 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun paslanmaz çelik yüzeylerde trikloro asetik asit uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri	224
Şekil 4.86 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun cam yüzeylerde proteaz uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri	225

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyal biyofilmlerdeki hücre dışı polimerik bileşenlerin fonksiyonları.....	15
Çizelge 2.2 Süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde bulunabilen bazı termofilik izolatların özellikleri	25
Çizelge 2.3 Bazı termofilik basil sporlarının ısı direnç profilleri	33
Çizelge 2.4 Süt endüstrisindeki termofilik basillerin giderimi için kullanılan yaklaşımlar stratejiler	52
Çizelge 3.1 Çalışma dahilinde biyofilm üretim miktarları belirlenen <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> izolatları ile referans suşlarının sayıları	58
Çizelge 3.2 Ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri itibariyle	59
Çizelge 3.3 Medium I Agar besiyeri içeriği	65
Çizelge 3.4 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği	65
Çizelge 3.5 Standart tam yağlı süt içeriği	65
Çizelge 3.6 Bazal Medium içeriği.....	66
Çizelge 3.7 Laktoz katkılı Bazal Medium içeriği	66
Çizelge 3.8 Skim Milk Agar içeriği	66
Çizelge 3.9 1 N NaOH çözeltisi içeriği.....	66
Çizelge 3.10 1 N HCl çözeltisi içeriği	67
Çizelge 3.11 Serum fizyolojik içeriği	67
Çizelge 3.12 Kristal viyole çözeltisi içeriği	67
Çizelge 3.13 Metanol çözeltisi içeriği.....	67
Çizelge 3.14 Etanol/Aseton çözeltisi içeriği	67
Çizelge 3.15 % 10'luk SDS çözeltisi içeriği	67
Çizelge 3.16 1 mg/mL'lik glukoz çözeltisi içeriği.....	67
Çizelge 3.17 % 5'lik fenol çözeltisi içeriği	68
Çizelge 3.18 BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisi içeriği	68
Çizelge 3.19 Protein tayininde kullanılan A ve B reaktifi içerik ve miktarları.....	68
Çizelge 3.20 Kloroform/izoamil alkol çözeltisi içeriği.....	68
Çizelge 3.21 Fenol/kloroform/izoamil alkol çözeltisi içeriği	68
Çizelge 3.22 % 70'lik etanol çözeltisi içeriği	68

Çizelge 3.23 Tris-EDTA tamponu içeriği.....	69
Çizelge 3.24 10 mM Tris-HCl tamponu içeriği	69
Çizelge 3.25 50 mM Tris-HCl tamponu içeriği	69
Çizelge 3.26 0,02 N HCl tamponu içeriği.....	69
Çizelge 3.27 50 mM Sodyum asetat tamponu içeriği	70
Çizelge 3.28 Sodyum fosfat- NaCl tamponu içeriği	70
Çizelge 3.29 Borat - CaCl ₂ tamponu içeriği	70
Çizelge 3.30 50mM Glisin-NaOH tamponu içeriği	70
Çizelge 3.31 Negatif test kuyularından elde edilen optik yoğunluk (OD) değerlerine göre sınır değerlerin (cut off) hesaplanması	72
Çizelge 3.32 Çalışma kapsamındaki referans suşların ve izolatlarının ideal biyofilm üretim koşulları	83
Çizelge 3.33 Çalışmada kullanılan sanitasyon prosedürleri ve kullanım amaçları	88
Çizelge 3.34 İlgili çalışmada referans suşlar için biyofilm örneklemesinde tercih edilen abiyotik yüzeyler.....	89
Çizelge 3.35 Çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan sanitasyon ajanları.....	91
Çizelge 3.36 Çalışma kapsamında uygulanan koşullar (abiyotik yüzeyler-s anitasyon ajanları).....	92
Çizelge 4.1 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri.....	95
Çizelge 4.2 Çoklu çevresel değişkenlerin <i>Geobacillus</i> cinsine üye bakterilerin biyofilm üretimi üzerine olan etkileri.....	102
Çizelge 4.3 Çoklu çevresel değişkenlerin <i>Anoxybacillus</i> cinsine üye bakterilerin biyofilm üretimi üzerine olan etkileri.....	105
Çizelge 4.4 <i>Geobacillus</i> ve <i>Anoxybacillus</i> izolatlarının ve referans suşlarının standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri.....	106
Çizelge 4.5 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme özelliklerinin belirlenmesi	113
Çizelge 4.6 Paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretim miktarları saptanacak olan 23 bakterinin biyofilm üretim ve fenotipik karakteristikleri	119
Çizelge 4.7 İleriki çalışmaları devam ettirmek adına seçilen bakterilerin listesi.....	121
Çizelge 4.8 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>A. caldiproteolyticus</i> A403).....	124

Çizelge 4.9 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T)	125
Çizelge 4.10 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>A. kamchatkensis subsp. asaccharedens</i> F81)	126
Çizelge 4.11 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T)	127
Çizelge 4.12 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyeleri)	128
Çizelge 4.13 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T).....	129
Çizelge 4.14 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>G. thermoglucosidans</i> B84a).....	130
Çizelge 4.15 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (<i>G. thermodenitrificans</i> D195).....	131
Çizelge 4.16 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri.....	132
Çizelge 4.17 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (Tüm <i>Geobacillus</i> üyeleri)	133
Çizelge 4.18 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> üyelerinin mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri için gereken en ideal NaCl konsantrasyonları	133
Çizelge 4.19 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	135
Çizelge 4.20 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	136
Çizelge 4.21 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	137
Çizelge 4.22 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	138
Çizelge 4.23 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	139

Çizelge 4.24 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	140
Çizelge 4.25 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	141
Çizelge 4.26 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	142
Çizelge 4.27 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	143
Çizelge 4.28 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	144
Çizelge 4.29 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	145
Çizelge 4.30 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	146
Çizelge 4.31 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	147
Çizelge 4.32 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	148
Çizelge 4.33 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri	149
Çizelge 4.34 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri.....	150
Çizelge 4.35 <i>A. caldiproteolyticus</i> A403 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	173
Çizelge 4.36 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	174
Çizelge 4.37 <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharadens</i> F81 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	175
Çizelge 4.38 <i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T standart suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	176
Çizelge 4.39 Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyelerinin tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	177

Çizelge 4.40 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T referans suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	178
Çizelge 4.41 <i>G. thermoglucosidans</i> B84a izolatının tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	179
Çizelge 4.42 <i>G. thermodenitrificans</i> D195 izolatının tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	180
Çizelge 4.43 <i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T referans suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları.....	181
Çizelge 4.44 Tüm <i>Geobacillus</i> üyelerinin tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları	182
Çizelge 4.45 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> üyelerinin farklı abiyotik yüzeylerdeki biyofilm üretim karakteristiklerine göre iki farklı inkübasyon sıcaklığında ve standart tam yağlı süt ortamında seçilen en ideal ikişer yüzey	183
Çizelge 4.46 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> cinsi üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip sütteki biyofilm üretim ve sporulasyon eğilimleri	197
Çizelge 4.47 <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> cinsi üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip sütte ve en ideal yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim ve sporulasyon eğilimleri	198
Çizelge 4.48 Termofilik biyofilm matrikslerinden elde edilen eDNA içeriklerinin konsantrasyonları ve genomic DNA-eDNA moleküler büyüklükleri	204

1. GİRİŞ

2012 yılında “biyofilm” terimi IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından; "mikroorganizmaların kendi ürettikleri ve hücre dışı ortama salgıladıkları polimerik bileşenlere (EPS) gömülü vaziyette bir yüzeye ya da ara yüzeye tutunmuş agregatlar olarak tanımlanmıştır (Vert vd. 2012). IUPAC bu tanıma ilaveten bazı ilave açıklamalarda da bulunmuştur:

- 1) Biyofilmler, kendisini oluşturan mikroorganizmaların dış çevrelerine adapte olabilecekleri şekilde organize olduğu sabit sistemlerdir.
- 2) “Slime” olarak da bilinen ve mikroorganizmaların kendi ürettikleri EPS matrisi, çeşitli yapısal formlardaki hücre dışı biyopolimerlerin birikmesiyle oluşmaktadır.

Mikrobiyal biyofilmlere yönelik yürütülen çalışmaların son yıllarda büyük bir ivmeyle artmasına bağlı olarak IUPAC tarafından öne sürülen bu tanım, biyofilm kavramını tam olarak açıklayacak mahiyettedir. Mevcut tanım; aynı zamanda klinik, farmakoloji, ziraat, gıda, biyoteknoloji ve atık giderim sahalarında da karşılaşılan tüm biyofilm sistemlerini kapsayacak şekilde bir betimleme olmuştur (Vert vd. 2012).

Yürütülen tez çalışması kapsamında, “biyofilm tanımı” çeşitli abiyotik yüzeylere tutunmuş bakterilerin vejetatif ve spor formlarının ürettikleri kompleks yapılar olarak ele alınmıştır. Biyofilm oluşumu için gereken ilk şart olan bakteriyel adezyonu, bakterinin tutunduğu yüzeyin topografisi ve fizikokimyası (fonksiyonel gruplar, yüzey yük karakteristiği, çeşitli kimyasalların varlığı, yüzeyin serbest enerjisi), çevresel koşullar (sıcaklık, pH, besinsel bileşenler, diğer mikroorganizmaların varlığı), özellikle gıda çevrelerindeki ürün işleme koşulları (akış hızı ve kuvveti), biyofilmi oluşturan bakterinin sahip olduğu birtakım özellikler (yeter sayı algılama mekanizması, EPS üretimi ve salgısı, pilus, fimbriya, adezin ve flagella gibi yapıların varlığı) belirlemektedir (Vert vd. 2012).

Doğada mikroorganizmalar planktonik formlarından farklı olarak biyofilm yapıları içerisinde organize halde bulunmaktadır. Biyofilmler, tek bir tür mikroorganizma tarafından tesis edilebileceği gibi birden fazla tür mikroorganizmanın da bir araya gelmesiyle oluşabilen kompleks sistemlerdir. Biyofilmler, sistemi oluşturan mikroorganizmalardan ve bu mikroorganizmaların hücre dışı ortama salgıladıkları, yapısal ve fonksiyonel proteinlerden, karbohidratlardan, hücre dışı DNA'dan ve lipidlerden oluşan matriks yapısından oluşmaktadır (Dongari-Bagtzoglou 2008, Donlan 2009). Matriks yapısı, biyofilmi oluşturan mikroorganizmaları biyotik ya da abiyotik yüzey/ara yüzeylerde stabil hale getirerek yakın ilişkide tutmak suretiyle hücreler arası iletişiminin gerçekleşmesine ve sinerjetik bir mikrokonsorsiyumun oluşumuna imkan sağlamaktadır (Flemming ve Wingender 2010).

Biyofilmler; insan yapımı ve doğal su sitemleri, gıda üretim çevreleri, konakçı organizmaların biyotik (mukozal) yüzeyleri, kayaçlar, buzullar, gıda ve gıda ambalajları, klinik sahada yaygın kullanımı olan damar ya da üretra içi kateterler, dental yüzeyler gibi doğadaki hemen hemen tüm abiyotik ya da biyotik yüzeyler üzerinde saptanabilmektedir. Biyofilm yapıları içerisindeki mikroorganizmaların planktonik karşılıklarına oranla çok çeşitli stres faktörüne karşı daha dayanıklı ve inatçı olmaları, klinik ve endüstriyel sahalarda bazen önü alınamayan sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Gupta vd. 2016).

Termofilik basiller kendi doğal sıcak su kaynaklarında veya kaynaklara yakın topraklarda yaşadıkları gibi, enerji ve turizm sektöründe kullanılan insan yapımı jeotermal sondaj borularında bir süre sonra ortamdaki organik ve inorganik maddeler ve diğer mikroorganizmalarla beraber mikrobiyal bir kütle oluşturacak şekilde bir biyofilm tabakası meydana getirerek, boruların tıkanmasına sebep olmaktadır. Endüstriyel açıdan önemli olan biyofilmler, borular içindeki suyun veya diğer sıvıların akışını yavaşlatabilmekte ve dolayısıyla boruların korozyonunu arttırmaktadır (Flint vd. 1999, 2001a, b, Ronimus vd. 2003, Rueckert vd. 2005, Burgess vd. 2009, Somerton vd. 2015).

Son yıllarda yüksek sıcaklıklara adaptasyon yetenekleri nedeniyle, termofilik bakterilerin çeşitli habitatlardan izole edilerek bu ekstrem ortamlara adaptasyon

yetenekleri üzerine çok fazla çalışma yürütülmektedir. Termofilik bakteriler 45-85 °C'lik sıcaklıklarda gelişebilen, sıcaklığa dayanıklı bakterilerdir. Termofilik basiller sıcaklığa adaptasyon mekanizmalarının yanında, bu çevrelerde diğer termofilik bakterilere göre, ekstrem koşullarda endospor oluşumu gibi çok önemli bir avantaja sahiptir. Termofilik basillerin ısıya dayanıklı olmalarına olanak sağlayan endospor yapıları toprağa, endüstriyel işlemlerde soğutma amacıyla kullanılan soğutma sularına ve diğer ortamlara karışması sonucunda endüstriyel anlamda önemli bir paya sahip olan süt ve süt ürünlerinin, meyve sularının, glukoz şuruplarının yapımında kullanılan büyük ölçekteki endüstriyel fermentörlerde yüksek sıcaklığa maruz kalmalarına rağmen, ürünleri kontamine edebilmekte ve bu ortamlarda kolaylıkla gelişebilmektedir. Sporların gelişmesi sonucunda ortamdaki popülasyonda baskın hale gelen termofilik basiller fermentörlerin biyokorozyonuna ve istenmeyen bir mikrobiyal yüke neden olmaktadır (Etoa ve Michiels 1988, Flint vd. 2001b). Günümüze dek yürütülen çalışmalarda elde edilen bulgular daha çok, termofilik basillerin sadece DNA, RNA ve protein gibi sahip oldukları makromoleküllerin yapılarını değişikliğe uğratarak yüksek sıcaklıklara uyum sağlamaları yönündedir. Ancak son zamanlarda termofilik bakteriler ve mezofilik bakteriler ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, söz konusu makromolekül yapılarında çok önemli farklılıklar olmadığı saptanmıştır. Bu bağlamda termofilik basillerin termostabilitelerine yönelik yeteneklerine katkı sağlaması itibariyle bakteriyel biyofilm çalışmaları son yıllarda daha da önem kazanmıştır. Termofilik basillerin biyofilm oluşturma gerekçeleri arasında; korunma, savunma, iletişim kurma, hücrelerin uygun bir nişte kalmalarını sağlama ve doğal ortamları içinde birbirleri ile yakın ilişkide olmaları gelmektedir (Flint vd. 2001a, Parkar vd. 2003, Burgess vd. 2009). Sonuç olarak, termofilik basiller biyofilmleri ile bulunabilecekleri zorlu koşullara daha fazla dayanıklı olabilmektedir. Termofilik basiller, içsel termostabiliteleri, endospor oluşturmaları ve bu iki önemli yetiye ilave olarak biyofilm oluşturabilmeleri nedeniyle son yıllarda biyofilm çalışmalarına dahilinde yeni bir odak oluşturmuştur.

Süt ve süt ürünlerinin işlendiği çevrelerden en çok izole edilen iki bakteri olan *Geobacillus* spp. ve *Anoxybacillus flavithermus* bakterileri de termofilik basillere dahil olup, sütü kontamine eden ve süütün işlenerek süt tozuna dönüştürülmesi neticesinde

kontaminant olarak varlıklarını sürdüren başlıca endospor üreten bakteriler arasında gelir. Süt tozunda bulunan termofilik basil sayısı, sütün işleme ve market satış kalitelerinin belirlenmesi açısından önemlidir. *Geobacillus* spp. ve *A. flavithermus* özellikle 70 °C'ye dek yüksek sıcaklıklara çıkabilen ısı değişim plakaları ve buharlaştırıcı gibi süt tozu işleme birimlerinde sütün temas ettiği yüzeylerde biyofilm yapıları geliştirebilmektedir. Buralarda gelişen biyofilmler, süt ürünlerinin sürekli kontaminasyonları için kaynak teşkil etmektedir (Burgess vd. 2009, Hill ve Smythe 2012). Süt tozlarında saptanan termofilik basillerin büyük bir kısmı söz konusu biyofilm yapılarından köken almaktadır (Hill ve Smythe 2012).

A. flavithermus ve *Geobacillus* spp. gibi süt endüstrisinde önemli kontaminantlar olarak bilinen bu basillerin birçoğu patojenik olmamasına karşın, süt ürünlerin içerisindeki varlıkları, ürünlerin kötü hijyen koşullarında işlendiklerinin bir belirteci olmakla birlikte, yine süt ürünleri içerisinde yüksek düzeyde bulunmaları da ürünlerin tüketicilere sunulmasına engel teşkil etmektedir. İlave olarak, bu basillerin süt ürünleri içerisinde gelişmeleri kötü kokuların gelişimine neden olan asit ya da birtakım enzimlerin üretilmesine bağlı olarak gıda kalitesini önemli oranda düşürmektedir. Süt endüstrisindeki bazı ürün işleme koşulları bu tip basillerin gelişimlerine de önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Bu gruba dahil bakteriler süt ürünlerinin işlendiği ünitelerde sıcaklığın 40–65 °C'ye ulaştığı noktalarda çok hızlı bir şekilde gelişip çoğalma olanağı bulmaktadır. Hepsinden öte söz konusu basillerin spor oluşturabilmeleri, onların elimine edilmelerini oldukça zorlaştırmaktadır. Ayrıca, bu basiller geniş bir sıcaklık aralığında hızlı bir şekilde çoğalabilmekte (jenerasyon zamanı yaklaşık 15-20 dakika) ve biyofilm oluşturma eğiliminde olabilmektedir (Burgess vd. 2010, Hill ve Smythe 2012). Süt endüstrisinde termofilik basil biyofilmlerinin uzaklaştırılması, engellenmesi ya da geciktirilmesi için birçok strateji uygulanmakta fakat; bu stratejiler çoğu kez yetersiz kalmaktadır. Bu durum, termofilik basil biyofilmlerinin yapısallığına ve kompozisyonlarına yönelik bilginin kısıtlı olmasıyla da ilişkilidir. Ayrıca güncel temizlik rejimleri termofilik basil biyofilmleriyle mücadeleyi hedefleyecek nitelikte değildir. Süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde termofilik biyofilm yapılarının ve biyofilm üretim sürecinin sporulasyon ile olan ilişkilerinin daha net bir şekilde açıklanabilmesi ile etkin temizlik stratejilerinin de geliştirilmesine imkan tanıyacaktır.

Süt ve süt ürünleri, insanların en çok tükettiği gıdaların başında gelmektedir. Türkiye, süt ve süt ürünlerinin üretimi açısından değerlendirildiğinde, yıllık 16 milyon tonluk üretimle, Dünya’da ilk 15 ülke arasında bulunmaktadır (www.tepav.org, 2011). Ülkemizde tüketimi yaygın olan süt ve süt ürünleri, çoğunlukla küçük işletmelerde hijyenik olmayan şartlarda üretilmektedir. Sütün florasından sıklıkla izole edilen *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi termofilik bakteriler, süt ürünlerinin üretim sürecinde pastörizasyon ve süt tozu üretiminde kullanılan tanklarda, yüksek sıcaklıklara maruz kalmalarına karşın kolaylıkla gelişebilmekte ve hem fermentörlerin biyokorozyonuna hem de bu tür ortamlarda istenmeyen bir mikrobiyal yükün oluşmasına neden olmaktadır. Patojen olmamalarına rağmen, bu bakterilere süt ürünlerinin işlendiği ünitelerde rastlanması düşük hijyen koşullarına işaret etmektedir. Termofilik basillerin bu çevrelerde çoğalmaları, bazı hücre dışı enzimlerin ortama salınmasına neden olarak asidik özellikte ürünlerin oluşumuna ve sonuç olarak besin kalitesinin düşmesine ve hatta gıda bozulmalarına sebep olmaktadır. Ayrıca, termofilik basillerin sporlarının ve vejetatif formlarının patojenlerle bir arada bulunma ihtimali, sporların uygun koşullarda çimlenerek yüzeylerde biyofilm oluşturabilmeleri, gıda bozulmasına neden olan ve patojenik olan diğer bazı mikroorganizmaların termofilik biyofilm yapıları içerisinde korunabilmeleri gibi nedenlerden ötürü, termofilik biyofilmler en az gıda patojenlerinin biyofilmlerinin yaratacağı riskler kadar sorun teşkil edebilmektedir (Flint vd. 2001a, Parkar vd. 2003, Burgess vd. 2009).

Ülkemizde süt ve ürünleri tüketimi, kayıtdışı tüketim de dahil Dünya ortalamasının üzerindedir. Türkiye’de üretilen sütün % 40’nın işlenmeden ambalajsız olarak tüketiciye ulaştırıldığı tahmin edilmektedir. Sokak sütü ve açık pazarlarda satılan süt ürünlerinin tüketimi de günümüzde yaygın olarak devam etmektedir (www.tepav.org, 2011). Günümüzde tüketicilerin bilinç düzeyinin artması, çevresel koruma ve sosyal sorumluluklar ile ulusal ve uluslararası mevzuatlar neticesinde tüketici güvenliğinin ön plana çıkması, gıda sektöründe uluslararası standartlara olan talebi arttırmaktadır. Süt ve ürünlerini de içeren gıda güvenliğinde uluslararası bir sistem olan HACCP (Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları), hammaddeden tüketicisine ulaşıncaya kadar gerçekleştirilen tüm basamakların, düzgün işletildiğinde olası tüm tehlikeleri oluşmadan önlemeyi ve tüketicileri sıhhi risklerden korumayı amaçlayan bir “risk yönetimi”

sistemidir. Ülkemizde uygun olmayan şartlarda üretilen süt ürünlerinde, depolamadan tüketiciye ulaştırılmasına kadar olan süreçte bozulmalar görülmektedir. Gıda güvenliğine ait riskler her geçen gün artmakta ve gerçek boyutuyla tüketicilere yansıtılmamaktadır. Süt ve süt ürünleri üretiminde olası riskleri önceden belirleyip, insan sağlığını tehdit edebilecek tehlikeleri en aza indirmek için HACCP sisteminin tüm işletmelerde uygulanması ve mevcut planların, termofilik basillerin de bu ortamlarda üreyebilmelerini göz önüne alarak yeniden değerlendirilmesi önem arz etmektedir (Hill ve Smythe 2012).

Yukarıda özetlenen bilgilerin ışığında, tez çalışması dahilinde;

- Termofilik basillerin ve onların biyofilmlerinin temel fizyolojik süreçlerinin anlaşılması,
- Sporulasyon-biyofilm oluşumu arasındaki ilişkilerin aydınlatılması,
- Hücre dışı DNA varlığının *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* gibi termofilik basillerin biyofilmlerinde kanıtlanması ve hücre dışı DNA'nın termofilik biyofilmlerdeki yapısal ve fonksiyonel rollerinin anlaşılması,
- Sütün içeriğindeki organik ve inorganik bileşenlerin termofilik basillerin gelişimine ve biyofilm üretimine olan etkilerinin belirlenmesi,
- Süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde sıklıkla kullanılan bazı yüzey materyallerinin termofilik basillerin biyofilm üretim süreçlerine olan etkilerinin anlaşılması,
- Statik ve dinamik koşullar simüle edilerek termofilik biyofilmlerin gelişim süreçlerinin ve bu süreçle biyofilm oluşumunun sporulasyon kinetiğiyle olan ilişkisinin karşılaştırılması,
- Termofilik basillerin sanitasyonunda tercih edilen uygulamaların termofilik biyofilmler üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi ve yorumlanması,
- Değerlendirilen sanitasyon uygulamalarının Konfokal Lazer Mikroskopisi gibi ileri tekniklerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde, özellikle *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* gibi süt ürünlerinin işlendiği çevrelerden en çok izole edilen üyeleri içeren termofilik cinslerin biyofilmlerine yönelik

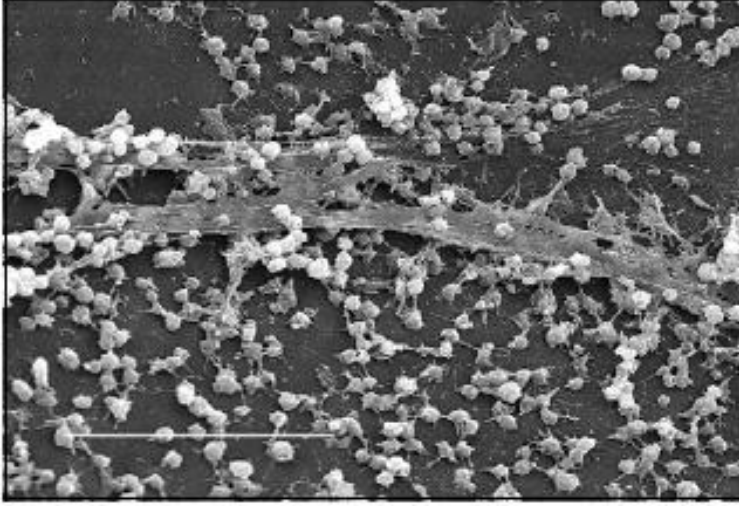
oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmalar termofilik biyofilmleri ve bu biyofilmlerin beraberinde getireceği sorunları bütünlüklü bir şekilde ele almamaktadır. Söz konusu çalışmalarda sadece *A. flavithermus* ve *Geobacillus* spp. gibi iki termofilik türe odaklanılmıştır. Tez çalışmasının başlangıcında kültür koleksiyonumuzda bulunan çok sayıda termofilik basilin biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiş olup, literatürde vurgulanan türlerin haricinde diğer pek çok termofilik basilin de biyofilm üretim kabiliyetleriyle, süt ve süt endüstrisi için sorun teşkil edebilecek potansiyelde oldukları kanıtlanmıştır. Tez çalışması, mevcut sorunları ve termofilik basillerin biyofilmlerini her yönüyle ele alındığı çok kapsamlı mahiyette bir içeriğe sahiptir. Çalışma bu yönüyle birçok soruyu aydınlatmasının yanı sıra beraberinde yeni ve özgün çalışma konularını da gündeme getirmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

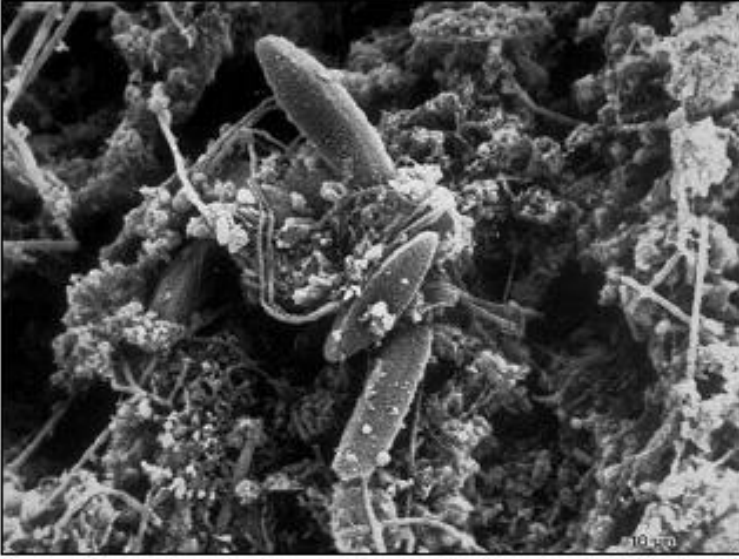
2.1 Biyofilmin Kısa Tarihçesi, Tanımı, Genel Oluşum Mekanizmaları ve Özellikleri

2.1.1 Biyofilmin kısa tarihçesi

Bakteriyel biyofilm kavramı ilk olarak 1683 yılında Antonie van Leeuwenhoek tarafından ifade edilmiştir. Araştırmacı, insan dışından kazıdığı plakları kendi ilkel mikroskopunda incelemiş ve bu gözlemlerindeki yapılara “animalkuli” adını vermiştir. Heukelekian ve Heler (1940) deniz mikroorganizmaları için “şişe etkisi” kavramını öne sürmüşlerdir. Bu etkide mikroorganizmaların cam yüzeyler üzerine tutunup kolonize oldukları açığa çıkarılmıştır. Antonie van Leeuwenhoek’tan 250 yıl sonra, ZoBell ve Eshter (1935) ışık mikroskopunda bazı deniz bakterilerinin cam slaytların yüzeylerine tutunup mikrokoloniler oluşturduğunu tespit etmiştir. Bu araştırmacılar aynı zamanda cam yüzeylerdeki bu yapıların yıkama ya da çalkalamayla dağılmadığını da belirlemiştir. Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin klor gibi bazı dezenfektanlara dirençli olabileceklerini keşfetmiştir (Characklis 1973). Sonrasında bakterilerin biyofilmler içerisinde çok çeşitli yollarla organize olabilecekleri saptanmıştır. Örneğin; farklı bakteriyel türler ağızda farklı mikroflora üyeleri ile birlikte tutunma özelliği göstermektedir. Mikroelektrot teknolojisiyle birlikte ışık mikroskopisinde sağlanan gelişmeler sonucunda, bakteriyel biyofilmlerin bir yüzeye tutunmuş mikrokolonilerden oluştuğunu ve bu mikrokolonilerle birlikte biyofilmlerin organize ve gelişmiş bir şekilde fonksiyonel heterojeniteye sahip oldukları anlaşılmıştır. Biyofilm üzerinde yürütülen çalışmalar, ekolojik ve endüstriyel sistemlerin dışında biyofilmlerin, halk sağlığı açısından da ciddi bir önem taşıdığını açık bir şekilde ortaya koymuştur (Şekil 2.1 - 2.2), (Donlan 2001). Bakterilerin biyofilmler içerisindeyken tıbbi malzemelerin üzerinde uzun süre hayatta kalabilmelerinden ötürü, klinik sistemlerde de göz önünde bulundurulması gereken bir olgu olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 2.1 Stafilokokal bir biyofilmin medikal bir alet üzerinde geliştirdiği biyofilmin TEM mikrografı (Donlan 2001)



Şekil 2.2 Endüstriyel bir su sistemi içindeki 8 haftalık biyofilmin TEM mikrografı (Donlan 2001)

2.1.2 Biyofilmin tanımı

Genel olarak biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların sıvı faz içerisinde katı bir yüzeye tutunmasıyla başlar. Bu yüzeyler bazı durumlarda besinsel bileşenlerle kaplanarak yüzeylere tutunan mikroorganizmaların gelişip çoğalmasına imkân tanımaktadır (Costerton vd. 1987). Bakteriye biyofilmler; bir nesneye, ara yüzeye ya da birbirine yapışık halde duran bakteri toplulukları olarak tanımlanmaktadır (Costerton vd. 1995). 1980'lerde ve 1990'larda bakteriyel biyofilmlerin yapısal, karmaşık sistemler olduğu gerçeği anlaşılmağa başlanmıştır. Biyofilm, Costerton ve ortak çalışma gruplarının elde ettiği veriler doğrultusunda; birbirlerine, yüzeylere ya da arayüzelere bir matriks aracılığıyla tutunan bakteriyel populasyonlar olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, Donlan ve Costerton (2002) tarafından yeni bir biyofilm tanımı yapılmıştır: Buna göre; arayüzelere, birbirlerine ya da bir substrata geri dönüşümlü olarak tutunmuş ve ürettikleri hücre dışı polimerik matriksin içine gömülmüş, farklı mikrobiyal gelişme fizyolojileri ve farklı genetik ifade ile ilişkili biçimde değişen bir fenotip sergileyen yapılar, biyofilm olarak adlandırılmıştır.

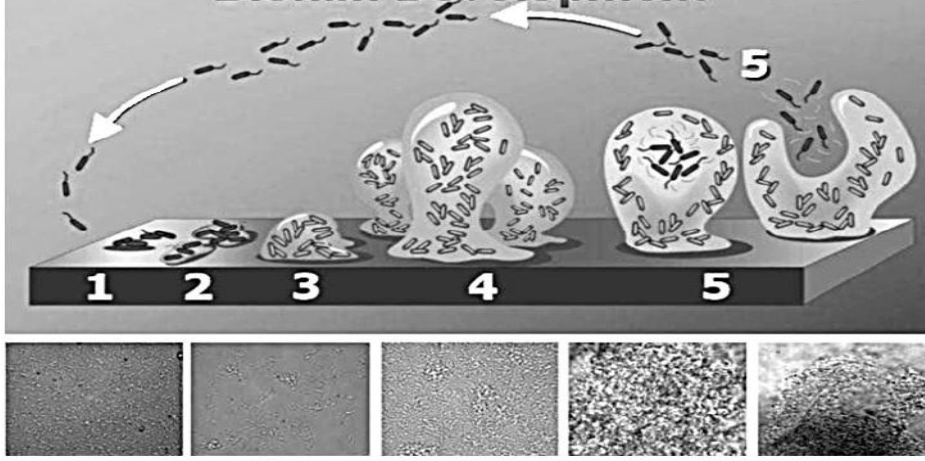
Ayrıca, mikrobiyal agregatlar, genellikle sıvı-hava ya da katı-sıvı arayüzlerde sulu hücre dışı polimerik bileşenlerden (EPS) oluşan matriks yapılarına gömülü vaziyette akümüle olan yapılardır. EPS, hücrelerin gömülü olduğu hücre dışı matriks materyalleri, çoğunlukla biyofilmi oluşturan hücreler tarafından üretilir. Matriks hücre dışı polimerik bileşenler olarak bilinen farklı tipteki biyopolimerlerin birikimiyle oluşmaktadır. Bu birikim üç boyutlu yapının iskeletini oluşturur. Bu iskelet, yüzey adezyonundan ve kohezyondan sorumludur. Bu ifade doğrultusunda biyofilm tanımından farklı olarak, flok (yüzen biyofilm yapıları) ve silaj yapıları da paylaştıkları bazı karakteristikler bağlamında biyofilm örnekleri olarak da gösterilebilirler (Flemming ve Wingender 2010).

2.1.3 Biyofilmin genel oluşum mekanizmaları ve özellikleri

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması; bakterilerin uygun bir yüzeye tutunmalarıdır. Doğal ortamlarında bakteriler, çevresel koşullarda hayatta kalabilmeleri ve kendilerini

koruyabilmeleri için biyofilm oluşturur. Herhangi bir yüzeyle etkileşime girecek olan bakteriyel hücreler tutunmadan önce yüzey boyunca hareket eder. Yüzeyle etkileşimden sonra aynı ya da farklı türlere dahil bakteriler bir araya gelip mikrokoloniler oluşturabilmek için tek tabakalı hücre hatları oluşturur. Biyofilmler, aynı türden bakterilerin bir araya gelmeleriyle oluşabileceği gibi, farklı türden bakterilerin bir araya gelmesi halinde daha karmaşık bir yapıda olabilir. Tutunma aktif bir süreç olup, bakterinin yüzeye ve diğer bakterilere geri dönüşümlü bir biçimde bağlanabilmesi için gerekli olan hücre dışı polimerlerin sentezini gerektirir (Costerton 1999). Bakterilerin geri dönüşümlü bir biçimde bağlanmalarının ardından bakteriyel hücreler çoğalır ve EPS üretir (Kumar ve Anand 1998). Biyofilmler, elastiki davranış sergileyen oldukça dayanıklı esnek yapılardır (Stoodley vd. 1998). Bakteriyel türlere bağlı olarak biyofilmler; % 10-25 bakteri hücrelerinden ve % 75-90 hücre dışı polimerik matriks bileşenlerinden oluşur. Biyofilm içerisindeki bakterilerin “Brown” hareketinden yoksun olmaları karakteristik bir özelliktir. Biyofilmler sıklıkla mantar benzeri yapılar sergiler. Bu yapının baş kısmında hücresel yoğunluk, sap kısmına oranla daha fazladır (Costerton 1999). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır; bu su dolu kanallar primitif bir dolaşım sistemine analog olacak şekilde metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yapar. Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında biyofilmden kopmalar görülebilir. Biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilir (Aparna ve Yadav 2008).

Biyofilmler beş temel aşamada oluşur: Bunlar; i) bakterilerin yüzeye temas geçmeleri, ii) bakterilerin yüzeye sıkıca tutunabilmeleri için EPS üretmeleri, iii) biyofilm yapısının erken gelişimi, iv) biyofilmin olgunlaşması, v) olgun biyofilm üzerinden hücrelerin koparak ayrılmasıdır (Şekil 2.3), (Stoodley vd. 2002).



Şekil 2.3 Biyofilm oluşumunun aşamaları ve bu aşamaları gösteren mikrograflar (Stoodley vd. 2002)

1) Mikrobiyal tutunma, 2) Geri dönüşümsüz tutunma ve EPS salgılanması, 3) Erken gelişim safhası, 4) Olgunlaşma, 5) Dağılıma.

Biyofilm oluşumu en az üç mekanizmayla açıklanabilen bir süreçtir. Bunlardan birincisi; yüzey hareketi sonucunda tutunmuş hücrelerin yeniden dağılmasıdır. İkinci bir oluşum mekanizması; tutunmuş bakteri hücrelerinin ikiye bölünerek çoğalmasıyla ilgilidir (Heydorn vd. 2000). Hücre bölünmesiyle birlikte yavru hücreler tutundukları yüzeyden yukarı istikamette biyofilme yayılır ve kolonizasyonla yeni hücre kümeleri oluşturur. Üçüncü mekanizma, sıvı fazda planktonik halde bulunan bakterilerin gelişmekte olan biyofilmin üzerine birikmesiyle ilgilidir. Bu mekanizmaların biyofilm oluşumuna görece katkıları, mevcut bakterilerin türüne, kolonize olunan yüzeyin doğasına ve çevrenin fizikokimyasal koşullarına bağlıdır.

Kondisyonlanma, gıdaların temas ettiği yüzeylerde besin moleküllerinin katı-sıvı ara yüzeylerde birikmesidir. Zamanla bu birikmeye bağlı olarak gıdaların temas ettiği yüzeylerde besinsel bileşenlerin konsantrasyonu artmaktadır. Sıvı fazdaki türbülans da mikroorganizmaların katı yüzeylere tutunmalarını hızlandırmaktadır (Kumar ve Anand 1998).

Mikrobiyal tutunma genelde iki aşama ile karakterize edilir: geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma. Başlangıçtaki geri dönüşümlü tutunmada zayıf van der Waals, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler kritiktir. Bu aşamayı takip eden geri dönüşümsüz tutunmada ise mikroorganizmaların hücre yüzeylerinde bulunan ve mikroorganizmaların yüzeylere çapalanmasına imkân tanıyan yapılar ve yine mikroorganizmaların hücre dışı ortama salgıladıkları polimerik yapışkan bileşenler son derece önemlidir (Ortega-Morales vd. 2008).

Kondisyonlanma ve biyofilm gelişim süreçleri yüzeylerin, mikroorganizmaların ve ulaşılabilen besinsel bileşenlerin tiplerinden etkilenmektedir (Speers ve Gilmour 1985, Herald ve Zottola 1988, Austin ve Bergeron 1995).

Çok hücreli biyofilmler stabil bir mikro konsorsiyum oluşturur. Bu oluşum içerisinde, fizikokimyasal gradientler oluşmakta, yatay gen transferleri meydana gelmekte ve hücre-hücre iletişimi gerçekleşmektedir. Bu konsorsiyum aynı zamanda yüksek rekabetçi bir çevre meydana getirir (Flemming ve Wingender 2010).

Biyofilmler, doğal çevrelerde yaygın bir şekilde bulunur ve cam, paslanmaz çelik, su boruları, implant, ve dişleri de içeren sayısız farklı ortamda gelişme gösterebilir (Carpentier ve Cerf 1993, Costerton vd. 1999, Woodward vd. 2000, Joseph vd. 2001). Biyofilmler bazı durumlarda antibiyotiklere ve dezenfektanlara toleranslı olmalarından ötürü hastalık etkeni bakterilere koruyucu bir yapı teşkil ederler (Costerton vd. 1987, Costerton vd. 1999, Ueda ve Kuwabara 2007, Janssens vd. 2008). Su endüstrisinde biyofilmler hem sorun olarak algılanan ve hem de istenilen yapılardır. Atık su arıtım uygulamalarında biyofilmler, bakteriler için substrat olabilecek su kirleticilerinin ortadan kaldırılmasında basit ve ucuz bir yoldur. İçme suyu endüstrisinde istenmeyen biyofilmler halk sağlığı açısından önemli sorunlara neden olmaktadır (Rittmann 2004). Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çok çeşitli bileşiklerin birikmesine neden oldukları için hem endüstriyel hem de tıp alanında büyük sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Møretro vd.

2009). Bu sebeple, biyofilm içerisindeki bakterilerin dezenfektanlara ve kurumaya karşı oldukça dirençli oldukları bilinmektedir (Matthysse vd. 1981, Zogaj vd. 2001).

Uzun süreli yapısal ve fonksiyonel araştırmalar sonucunda, mikroorganizmaların zorlu çevre koşullarında neden biyofilm oluşturdukları daha iyi anlaşılmıştır. Bu koşullar doğal, endüstriyel ve medikal çevrelerdeki koşullar olup, mikroorganizmalar bazı durumlarda bu çevrelerdeki biyotik ya da abiyotik yüzeylerde kolonize olarak komünite davranışı sergilemeye yönelebilir. Biyofilm yapılarında en dikkat çekici özelliklerden biri polimerik matriks içerisinde gömülü vaziyette bulunan bakterilerin planktonik yaşam tarzlarından farklı olarak fenotipik ve morfolojik farklılıklar sergilemeleridir (Davies 1999). Biyofilm yapısındaki bakteriler ve planktonik bakteriler arasında yaklaşık olarak % 1-10 arasında bakteriyel transkript farkı saptanmıştır. Gen ifade düzeyleri ve metabolizma aynı şekilde biyofilm oluşumunun farklı safhalarında çeşitlilik gösterir (Schembri vd. 2003, Webb vd. 2003, Beloin ve Ghigo 2005). Gram negatif bakterilerde çeşitli çevresel koşullar (örneğin; besin arzı, konakçı metabolitleri, kolonize olunan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal nitelikleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, tuz konsantrasyonu ve ozmolarite) ve bakterinin kendi ürettiği sinyaller (örneğin; indol, siklik-diguanilat, asetil fosfat ve N-asilhomoserin laktonlar) biyofilm oluşumunda, olgunlaşmasında ve dağılmasında rol oynar (Prouty vd. 2002, Shirtliff vd. 2002, Hammer ve Bassler 2003, Martino vd. 2003, Wolfe vd. 2003, Tischler ve Camilli 2004).

Mikroorganizmalar, ayrı ayrı hücrelerin saf kültürleri halinde bulunmayabilir. Çoğunlukla, yüzeylerde ya da arayüzeylerde akümüle olarak film, mat, flok, silaj ya da biyofilm gibi polimikrobiyal agregatlar oluşturur (Wingender ve Flemming 1999).

2.2 Biyofilm Matriksi

Biyofilmler içerisinde bulunan mikorganizmalar, kendi ürettikleri sulu EPS içerisine gömülü vaziyette kendi ideal dış çevrelerini yaratarak yaşar. EPS genellikle, polisakkaritlerden, proteinlerden, nükleik asitlerden ve lipitlerden oluşmaktadır. Bu yapısal bileşenler, biyofilmlere mekanik bir stabilite sağlar, yüzey adezyonunu

kolaylaştırır ve kohezif bir sistem oluştururlar. Bu üç boyutlu polimerik ağ, biyofilm içerisinde hücrelerin etkileşimini sağlar ve hücreleri immobilize eder. İlave olarak, biyofilm matriksi, eksternal bir sindirim sistemi gibi de fonksiyon gösterir. Hücrelerin yakınında bulunan hücre dışı enzimler, çözülmüş, kolloid yapıda ve katı biyopolimerlerin metabolize edilmesine yardımcı olmaktadır. Matriksin tesis ettiği bu karmaşık organizasyon düzeyi mikroorganizmaların dünya üzerindeki en başarılı yaşam formlarından birisi olmasını sağlamaktadır (Flemming ve Wingender 2010). Bakteriyal biyofilmlerdeki hücre dışı polimerik bileşenlerin fonksiyonları çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Bakteriyal biyofilmlerdeki hücre dışı polimerik bileşenlerin fonksiyonları (Flemming ve Wingender 2010)

Fonksiyon	Biyofilme olan ilişkisi	İçerdiği EPS bileşenleri
Adezyon	Başlangıç aşamasında biyotik ve abiyotik kolonizasyona imkan tanır ve biyofilmlerin uzun süre yüzeylere tutunmalarını sağlar.	Polisakkaritler, proteinler, DNA ve amfilik moleküller
Bakteriyal hücrelerin agregasyonu	Hücreler arasında köprü kurulmasını, geçici immobilizasyonu, yüksek hücresel yoğunluğun sağlanması ve hücre-hücre tanınmasını sağlar.	Polisakkaritler, proteinler ve DNA
Biyofilmlerin Kohezyonu	Mekanik stabiliteyi düzenleyen sulu bir polimer ağı oluşturur ve biyofilmin mimarisini belirler.	Nötral ve yüklü moleküller, proteinler (amilodler ve lektinler gibi) ve DNA
Suyun hapsedilmesi	Yüksek oranda sulu mikroçevreleri oluşturur ve kurumaya karşı koruma sağlar.	Hidrofilik polisakkaritler ve bazı muhtemel proteinler
Koruyucu bariyer	İnfeksiyon süresince spesifik ve non-spesifik konakçı savunmalarına karşı direnci sağlar ve çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı toleransı artırır. Oksidasyon ve avcı stresinden korur.	Polisakkaritler ve proteinler
Organik bileşenlerin emilimi	Çevreden besinlerin akümülyasyonunu sağlar ve zenobiyotiklerin emilimini kolaylaştırır (çevresel detoksifikasyon)	Yüklü ya da hidrofobik polisakkaritler ve proteinler

Çizelge 2.1 Bakteriyal biyofilmlerdeki hücre dışı polimerik bileşenlerin fonksiyonları (Flemming ve Wingender 2010) (devam)

İnorganik bileşenlerin emilimi	Polisakkaritlerin jelleşmesini ve iyon değişimini sağlar, mineralleşmeye imkan tanır ve toksik molekülleri akümüle eder (çevresel detoksifikasyon)	Fosfat ve sülfat bileşenleri içeren yüklü polisakkaritler ve proteinler
Enzimatik aktivite	Besinsel ihtiyaçların giderilmesi için ekzojen makromoleküllerin sindirimi ve yapısal EPS bileşenlerinin sindirimi (biyofilmden hücrelerin ayrılmasına imkan tanır).	Enzimler (proteazlar, lipazlar, nükleazlar vs.)
Besin kaynağı	Biyofilm komünitesindeki hücreler için karbon, azot ve fosfor kaynağı teşkil eder.	Potansiyel olarak tüm EPS bileşenleri
Genetik bilginin değişimi	Biyofilm hücreleri arasındaki yatay gen transferini kolaylaştırır.	DNA
Elektron vericisi ya da alıcısı	Biyofilm matriksi içerisinde redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar.	Proteinler (pilus ve nanotüpler) ve muhtemel nemli bileşenler
Hücre bileşenlerinin taşınması	Metabolik değişimlerin sonucu olarak hücre bileşenlerinin açığa çıkarılması.	Nükleik asit, lipopolisakkarit, fosfolipit ve enzimleri içeren membran vezikülleri
Fazla enerjinin depolanması	Dengesiz karbon ve nitrojen oranlarında fazla karbon kaynaklarının depolanması.	Polisakkaritler
Enzimlerin bağlanması	Polisakkaritlerle olan etkileşimlerinin sonucunda enzimlerin akümüle olması, depolanması ve stabilize edilmesi.	Polisakkaritler ve enzimler

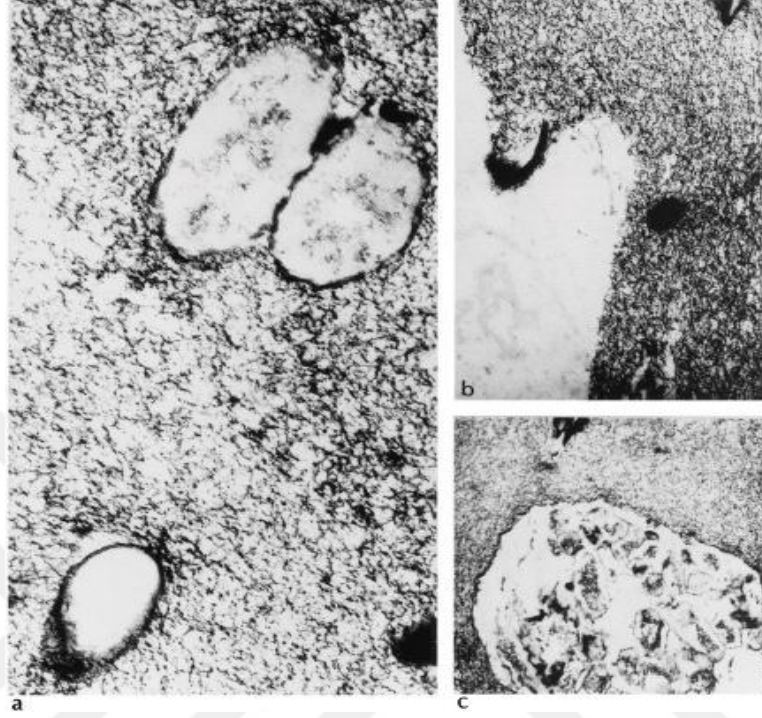
Bakteriler, çevresel yüzeyler ve arayüzeyler üzerinde, biyofilmler içerisinde organize olur. Biyofilmler, çoğunlukla kendisini oluşturan bakterilere iç ve dış çevresel tehditlere karşı koruma sağlar. Doğal olarak meydana gelmiş biyofilmler, çoğunlukla farklı bakteriyel türleri içermektedir. Ancak biyofilmlerin fizyolojik, kimyasal ve genetik karakteristiklerinin anlaşılmasında, laboratuvarlarda tek tip türlerin oluşturduğu

biyofilmlerin analizi daha kolay bir yoldur. Çok hücreli bir komünite oluşturmak üzere bir araya gelen hücrelerin yapısallığı, hücre dışı bileşenler tarafından belirlenir. Bu bileşenlerin çeşitliliğine göre de biyofilmlerin çeşitliliklerinden söz edilebilir (Branda vd. 2005).

Bilindiği üzere prokaryotlar, ortam koşullarına genetik düzenlemeler ile çok kolay uyum sağlar ve yüzeye yaklaşırken düzenleyici genlerin çalışmasıyla dakikalar içerisinde sesil yaşam fenotipine dönebilir. Planktonik ve sesil (bağlı) bakteriler arasındaki en çarpıcı farklılıklardan bir tanesi biyofilmin yapısallığı için gereken biyofilm matriksidir. Matriks bileşenleri; biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların türüne, biyolojik ve biyolojik olmayan birçok parametreye bağlıdır. Bu farklı bileşenler, salgılanan ekzopolisakkaritler, proteinler ve hücre dışı DNA'lardır. Ekzopolisakkaritler % 50-70 oranında organik karbon içerirler. Bakteriyel türlerin farklılığına bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin tipi ve miktarı çeşitlilik göstermektedir (Starkey vd. 2004). Bakteriyel virülense etkilerinden ötürü hücre dışı polisakkaritler uzun yıllardır çalışılmakta olan bir konudur. Hücre dışı polisakkaritler, kapsüler polisakkaritler ya da ekzopolisakkaritler şeklinde sınıflandırılmışlardır. Geliştirilen bakteri kültürleri santrifüj edildikten sonra, hücreyle bağlantılı şekilde kalan hücre dışı polisakkaritler kapsül olarak adlandırılırken, üst sıvı içerisinde kalan hücre dışı polisakkaritler, ekzopolisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm çalışmalarında bazı polisakkaritlerin izolasyonunun zor olması, biyofilmin kimyasal kompozisyonunun anlaşılmasına engel teşkil etmektedir (Branda vd. 2005).

Monosakkarit monomerlerinin β (1→4) glikozit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan selüloz, birçok bakteriyel matriks kompozisyonunda bulunan önemli bir bileşendir (Zogaj vd. 2001, Romling vd. 2002, Aparna ve Yadav 2008, Ma vd. 2009). Bakteriyel ekzopolisakkaritler biyofilm matriksinin en temel ögesidir. Matriks sulu bir tabiata sahip olup birçok türün biyofilminde anyonik bir karakter sergileyerek temel besinlerin ve minerallerin yakalanarak konsantre hale getirilmesine olanak sağlayan bir sistem oluşturur. Biyofilmler içerisinde yer alan bakteriler için çevresel tehditlere, biyositlere, antikorlara, surfaktanlara, serbest yaşayan amip gibi predatörlere ve beyaz kan hücrelerine karşı koruyucu bir avantaj sağlar. Matriks üç boyutlu bir kuvvet alanı

yaratarak bakterileri çevreler ve bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmalarını sağlayarak bakterilere stabilite kazandırır (Şekil 2.4), (Dunne 2000).



Şekil 2.4 Serbest ve matriksle çevrili mikrokolonilerin elektron mikrografları (Dunne 2000)

a. Serbest hücreler b. EPS biosentezi c. Mikrokolonizasyon.

Proteinler de biyofilm matrikslerde selüloz gibi önemli bileşenlerdendir. Proteinlerin miktarları ve tipleri biyofilm içerisindeki mevcut bakterinin türüne göre değişim gösterir. Biyofilm matriksin kompozisyonuna dahil edilen lektinler bu duruma tipik bir örnek teşkil etmektedir. Lektinler, piluslar ve Gram-negatif bakteri dış membranı gibi hücre yüzey yapılarıyla ilişkilidir ve bakterilerin hem birbirlerine hem de konakçılara spesifik bir şekilde tutunmalarına olanak sağlar (Starkey vd. 2004). Fimbriyalar temelde fimbrin adı verilen monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan yapısal elemanlar olup, bakterilerin inert yüzeylerle olan etkileşiminde önemli bir rol oynar (Collinson vd. 1991, Muller vd. 1991, Woodward vd. 2000). Diğer yandan hücre dışı DNA (eDNA), matriksin yapısalında önem teşkil eder. Bazı bakterilerin matriks yapısındaki DNA, rasgele bir şekilde kromozomal DNA'dan köken almakta ve bu DNA matriks içerisinde hücre-hücre etkileşimine katkı sağlamaktadır. Hücre dışı DNA'nın biyofilmin erken

oluşum safhalarında yapısallığa katkıda bulunan bir fonksiyon sergilediği de bilinmektedir (Starkey vd. 2004).

2.2.1 Hücre dışı DNA (eDNA)

Farklı birçok biyofilm örneğinde hücre dışı DNA'ya rastlanmaktadır. eDNA'ya atık su sistemlerindeki biyofilm örneklerinde de büyük miktarlarda rastlanmaktadır (Frolund vd. 1996). eDNA birçok bakteri türünün biyofilminde bulunmakta ve biyofilm yapılarında önemli bir yapısal eleman olarak fonksiyon göstermektedir.

Hücre dışı DNA biyofilm sistemlerinde çoğunlukla lize olan hücrelerden gelen kalıntı DNA parçalarından oluşmaktadır ve ilk tutunmadan biyofilmin olgunlaşmasına dek olan tüm süreçlerde önemli bir bileşen olarak rol almaktadır. Nükleik asitlerin mikrobiyal agregasyondaki rolü özellikle diğer major matriks bileşenleri arasındaki bağlantıların oluşturulması ile ilişkilidir. Örneğin *Rhodovulum* cinsi bakterilerin biyofilmlerine nükleolitik enzimler uygulandığında biyofilmler çok hızlı bir şekilde dağılılabılırken aynı cinsin biyofilmlerine proteinleri ve karbohidratları degrade eden enzimler uygulandığında biyofilm dağılmamaktadır (Watanabe vd. 1998). Hücre dışı DNA benzer şekilde *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinde de hücre-hücre etkileşimlerinin sağlanmasında önemli rollere sahiptir (Yang vd. 2007). Hücre dışı DNA'nın biyofilm sistemlerindeki yapısal ve fonksiyonel katkılarının saptanması için yapılan çalışmalarda DNaz I enzim uygulaması sonucunda *P. aeruginosa* ve *B. cereus*'un biyofilm oluşumlarının başlangıç safhalarında mikrobiyal adezyonun engellendiği görülmüştür. Elde edilen bulgular eDNA'nın ilk tutunmada bir adezin gibi rol üstlendiğini kanıtlar mahiyettedir (Whitchurch vd. 2002, Villain vd. 2009). Hücre dışı DNA, yapısal ve fonksiyonel etkilerinin yanı sıra antimikrobiyal bir ajan gibi de davranabilmektedir. Hücre dışı DNA, katyonları şelatlayarak lipopolisakkaritlerin ve dış membranın stabilizasyonuna katkı sağlamaktadır (Mulcahy vd. 2008).

eDNA, parçalanmış hücrelere ait kalıntı materyaller olarak görülmesine karşın, matriksin (Wingender vd. 1999) ve biyofilm yaşamının tamamlayıcı bir parçasıdır (Molin ve Tolker-Nielsen 2003). Bazı bakteri biyofilmlerindeki matrikste eDNA ve genomik

DNA'nın aynı orijinden geldiği görülmektedir (Steinberger ve Holden 2005). *S. epidermidis* biyofilmlerinin örneğinde ise, eDNA biyofilmdeki bakterilerin alt popülasyonlarındaki lizisleri süresince iki fonksiyonlu otolizin (AtlE) tarafından üretilmektedir (Molin ve Tolker-Nielsen 2003). Qin vd. (2007), *S. epidermidis* biyofilmlerinde AtlE otolizini bağlantılı eDNA'nın hücre dışına salınım mekanizması incelemiştir. Özetle eDNA biyofilm yapısındaki hücrelerin lize olması sonucunda açığa çıkan genomik DNA kalıntılarından oluşabileceği gibi, genomik DNA'dan bağımsız özel salgı mekanizmalarıyla da hücre dışı ortama salgılanabilmektedir.

2.3 Termofilik Basillerin Genel Karakteristikleri

Taksonomik çalışmalar *Bacillus* cinsinin dahil olduğu *Bacillaceae* familyasının oldukça geniş olduğunu kanıtlar mahiyetindedir (Ash vd. 1991, Rossler vd. 1991, Rainey vd. 1994). Seksenli yıllarda *Bacillus* üyelerinin tek bir ya da birden çok cinsine dahil olduğuna dair tartışmalar sürerken, bu süreç başlangıcındaki hibridizasyon çalışmalarıyla birlikte 16 rRNA dizi analizleri türlerin teşhisinde anahtar teknik olarak kullanılmaya başlamıştır (Sneath 1986, Rossler vd. 1991, Rainey vd. 1994). Doksanlı yıllarda hız kazanan bu tip çalışmalar, *Bacillus* cinsi üyelerinin yeniden sınıflandırılmasına ve bazı yeni cinslerin tanımlanmasına imkan tanımıştır (Wisotzkey vd. 1992, Shida vd. 1996, Heyndrickx vd. 1996, Heyndrickx vd. 1998, Waino vd. 1999, Yoon vd. 2002, Heyrman vd. 2003, Jay 2003, Goto vd. 2004, Yoon vd. 2004, Ren ve Zhou 2005, Cihan vd. 2014). Nazina vd. (2001) yaptıkları taksonomik çalışmayla *Bacillus stearothermophilus* tip suşunu, yeni tanımladıkları *Geobacillus* cinsine dahil etmişlerdir. *Bacillus flavothermus*, *Anoxybacillus flavithermus* türü olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Pikuta vd. 2000). 2001 öncesinde *B. flavithermus* ve *B. stearothermophilus* türleri *Bacillus* cinsi altında doğru olmayan bir taksonomik pozisyonda sınıflandırılmışlardır.

Bacillaceae familyasının üyeleri ve obligat termofilik basillerin besinsel gereksinimleri karmaşık olmamakla birlikte bu üyeler gelişimleri için özgül amino asitlerin varlığına gereksinim duymazlar. Bu üyeler triptik soy agar (TSA) gibi basit bir besiyeri içerisinde dahi kolaylıkla gelişebilmektedir. Termofilik basillerin ideal gelişme sıcaklıkları

genelde 50 ila 65 °C arasında değişmekle birlikte bu durum tür düzeyinde değişkenlik gösterebilmektedir. Sıcaklık bir mikroorganizmanın gelişimini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Üreme sıcaklıkları 80 °C'ye dek çıkabilen termofilik basiller termal adaptasyon yetileri, endospor ve biyofilm oluşturmaları nedenlerinden ötürü dünya üzerinde pek çok habitattan izole edilebilmektedir. Söz konusu doğal habitatlar arasında volkanik süreçlerle ilişkili olan artezyen kuyuları, sıcak su kaynaklarındaki sedimentler, taş, ağaç dalı gibi yüzeyler, kaynayan çamurlar, gün içinde devamlı güneşe maruz kalan toprak ve gübre yığınları, fermente hayvan yemleri gibi çeşitli karasal ve sucul ortamlar bulunmaktadır. Termofilik basiller, jeotermal termik santraller ve kömürle enerji üretilen santraller, sıcak su sondaj borularının iç yüzeyleri, süt ile süt ürünlerinin, meyve sularının, glukoz şuruplarının yapımında kullanılan ve çoğunlukla paslanmaz çelikten imal edilen büyük ölçekteki endüstriyel fermentörler gibi insan yapımı pek çok çevreden de izole edilebilmektedir (Nazina vd. 2001, Vieille ve Zeikus 2001).

2.3.1 *Geobacillus* cinsinin karakteristikleri

Geobacillus cinsi, *Bacillus* cinsinin rRNA Grup 5 olarak adlandırılan termofilik grup içerisinde sınıflandırılır (Ash vd. 1991). Günümüzde endospor oluşturabilen ve *Bacillaceae* familyasına dahil çok sayıda yeni termofilik basil cinsi teşhis edilmiştir. Bu termofilik cinslerden ilki *Geobacillus* olup, 2001 yılında *G. stearothermophilus* tip suşu ile tanımlanmıştır. Bu cins dahilindeki türler 16S rRNA dizilerine göre kendi aralarında % 96,5-99,5 oranında benzerlik gösterirler. Yine de bu cinsin üyelerinde G+C içeriği % 45 ila 69 oranında değişmektedir. Subterminalden terminale kadar çeşitlilik gösteren endosporlar üretirler. Bu cins, basil şeklinde morfoloji gösteren, endospor oluşturan, fakültatif anaerobik veya aerobik ve Gram-pozitif türleri kapsar. *Geobacillus* üyeleri 37-75 °C arasında gelişim göstermektedir (Nazina vd. 2001). İdeal gelişme sıcaklıkları 50 °C'nin üzerindedir. *Geobacillus* türleri kaplıca, petrol bölgeleri, derin deniz sedimentleri, süt ürünleri işlendiği fabrikalar ve şeker rafineleri gibi sıcak çevrelerden izole edilebildiği daha ılıman bölgelerden de izole edilebilmektedir (Zarilla ve Perry 1987, Nazina vd. 2001, Marchant vd. 2002, Ronimus vd. 2003, Tai vd.

2004, Takami vd. 2004, Scott vd. 2007). Günümüzde *Geobacillus* 20 tür ve 4 alt tür ile temsil edilmektedir (www.bacterio.net, 2010).

2.3.2 *Anoxybacillus* cinsinin karakteristikleri ve *A. flavithermus*

Anoxybacillus cinsi ise Pikuta vd. (2000) tarafından tanımlanmış olup, ilk defa *Anoxybacillus pushchinoensis* tip suşu ve *B. flavothermus* türünün *A. flavithermus* türüne dahil edilmesi sonucu iki tür ile temsil edilmiştir. *A. pushchinoensis* gibi zorunlu anaerobik olan tip türlerden ötürü bu cinsin adı *Anoxybacillus* olarak adlandırılmıştır (Pikuta vd. 2000). Ancak bu cinse daha sonra dahil olan üyelerin çoğunun aslında aerotolerant ya da fakültatif anaerobik oldukları görülmüştür. *Anoxybacillus* türlerine de *Geobacillus* üyelerinin bulunduğu birçok nişte rastlanmakta ve her iki cinsin üyeleri sıklıkla süt ürünlerinin işlendiği endüstri çevrelerinden izole edilebilmektedir. *Anoxybacillus* cinsi üyeleri de yine Gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şekilli, aerotolerant anaerobik ya da fakültatif anaerobik bakterilerdir (Coorevits vd. 2012). *Anoxybacillus* cinsinde ise 21 tür ve 3 alt tür tanımlanmıştır (www.bacterio.net, 2010).

Bu *Anoxybacillus* türlerinden özellikle *A. flavithermus*, süt ürünlerinin işlendiği ortamlardan izole edilip tanımlanan ilk termofilik basil olması sebebiyle önem taşımaktadır (Rückert vd. 2004). Aslında *A. flavithermus* ilkin Yeni Zelanda'daki bir kaplıcadan izole edilmiştir. (Heinen vd. 1982). Aynı tür daha sonrasında pek çok farklı sıcak su kaynağından da izole edilmiştir (Nold vd. 1996, Belduz vd. 2000). Bu tür kaplıcaların yanı sıra jelatin ekstraksiyon ünitelerinden (De Clerck vd. 2004a, De Clerck vd. 2004b, De Clerck vd. 2004c) ve süt tozu üretim ünitelerinden de izole edilmiştir (Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scott vd. 2007). *A. flavithermus* fakültatif anaerobik, terminal sporlara sahip olan, hareketli, pH 6-9 aralığında gelişebilen ve % 61 oranında G+C içeriğine sahip bir türdür (Heinen vd. 1982). Yeni Zelanda kaplıca suşunun karakterizasyonu bu suşun 30 ila 70 °C (ideal gelişim sıcaklığı 60 °C) gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildiğini göstermektedir. Ancak süt tozu üretim ünitelerinden izole edilen izolatların ideal gelişim sıcaklıkları 50 ila 65 °C arasında değişmektedir (Cucksey vd. 2002, Ronimus vd. 2003, Scott vd. 2005). Aslında 68 °C

inkübasyon sıcaklığı, süt tozundan izole edilebilen *A. flavithermus* ve *Geobacillus* suşlarının ayırımında önemli bir sıcaklık değeridir (Burgess vd. 2010).

2.4 Termofilik Basillerin Süt ve Süt Ürünleri Endüstrisindeki Önemi ve Neden Olabilecekleri Riskler

Süt endüstrisi açısından, termofilik basillerin süt ürünleri içerisindeki varlığı, tıpkı ameliyathanelerdeki sterilizasyon kontrol kitlerine benzer şekilde, hijyen kontrolünün bir indikatörü olarak kullanılmaktadır. Termofilik basiller süt ürünlerinin işlendiği ünitelerde endospor ve biyofilm üretebilmektedirler. Buna ilave olarak ürettikleri enzimler ve asidik son ürünlerden ötürü gıdalarda bozulmaya neden olmaktadır. Bu bozulmalar gıdalarda kötü kokuya sebebiyet vermektedir. Termofilik basiller işlem sıcaklıklarının yüksek olduğu (40-65 °C) birçok endüstriyel süreçte ya da ürünlerin depolanmasını gerektiren koşulların söz konusu olduğu çevrelerde potansiyel kontaminantlar olarak sıklıkla risk oluşturmaktadırlar. Bahse konu olan süreçlere; kağıt üretimi, konserve, meyve suyu pastörizasyonu, şeker işleme, jelatin üretimi, kurutulmuş sebze üretimi ve süt ürünlerinin işlenmesi gibi uygulamaların dahil olduğu süreçler örnek gösterilebilir (Denny 1981, Hayes 1985, Splittstoesser vd. 1998, Suihko vd. 2004, Tai vd. 2004, De Clerck vd. 2004a, b, c, Jay vd. 2005, Chen vd. 2006, Scott vd. 2007).

Süt endüstrisinde, ürünlerden izole edilen ve tanımlanan termofilik basiller gelişmeleri için duydukları sıcaklık gereksinimlerine göre zorunlu ve fakültatif termofiller olmak üzere ikiye ayrılırlar. Zorunlu termofillere süt ürünlerinin işlendiği ortamlardan sıklıkla izole edilen *A. flavithermus* ve *Geobacillus* spp. gibi üyeler örnek verilebilir (Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scott vd. 2007). Fakültatif termofiller *Bacillus* cinsine dahil olup hem mezofilik hem de termofilik sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* ve *Bacillus subtilis* fakültatif termofiliklere örnek olarak gösterilebilir (Crielly vd. 1994, Flint vd. 2001b, Ronimus vd. 2003, Scheldeman vd. 2006). *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* üyelerinin de dahil olduğu, süt ürünlerinin işlendiği çevrelerdeki bazı termofilik basillerin özellikleri çizelge 2.2’de verilmiştir.

Süt ürünlerinin işlendiği ünitelerdeki sütün temel kompozisyonunu oluşturan bileşenlerin varlığı, bu ortamlarda bulunabilen mikroorganizmaların gelişimlerine ve çoğalmalarına imkân tanıyarak biyofilm oluşumunun tetiklenmesi açısından potansiyel risk oluşturmaktadır (Speers ve Gilmour 1985). Süt, işlendiği çevrelerde sıklıkla paslanmaz çelik yüzeylerle temas etmektedir ve bu temas birçok mikroorganizmanın buralara tutunarak biyofilm oluşturmasına olanak sağlamaktadır (Barnes vd. 1999).

Mandıra endüstrisi kolaylıkla (yağ ve peynir) ya da kısmen bozulabilen (süt tozu ve kazein) ürünlerin üretimini kapsayan bir endüstridir. Steril bir sağım aşamasından sonra inek sütünün, taşıma, depolama ve işleme gibi birçok aşamada kontamine olma riski bulunmaktadır. Sağım aşamasındaki kontaminasyon, sıklıkla ineğin memesinde ya da sağım makinesinde bulunan mikroorganizmalarca gerçekleşmektedir. Süt bir kez sağıldıktan sonra çiftliklerde 7 °C'de 48 saate kadar bekletilebilmektedir. Soğuk koşullarda bekletilen sütün içerisinde psikrofil mikroorganizmalar haricinde birçok mikroorganizmanın gelişimi inhibe olmaktadır. Sütün transfer edildiği depolarda ve transfer hatlarında bekletildiği depolarda soğutma işlemi olmadığından kontaminasyon riski özellikle bu aşamalarda yüksektir. Tüm bu süreçlerde sütün bulunduğu ortamdaki çevresel sıcaklık, sütün içindeki mikroorganizmaların gelişimini belirleyen en önemli faktördür (Flint vd. 1997).

Çizelge 2.2 Süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde bulunabilen bazı termofilik izolatların özellikleri (Burgess vd. 2010)

	<i>Anoxybacillus flavithermis</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
Azami gelişme sıcaklığı (°C)	65–72	65–68	70	50–55	45–55 ^b	57–61	50–55	45–55
Asgari gelişme sıcaklığı (°C)	30–38	37	35–47	15	5–20	15–25	5–15	20
Anaerobik gelişim	+	–	–	+	–	+	–	–
pH aralığı	6,0–9,0	6,0–8,0	5,2–8,0	5,5–8,5	5,5–8,5	4,0–10,5	5,5–8,5	Bilinmiyor
Spor şişkinliği	+	+	+	+	–	D	–	–
Spor pozisyonu	Terminal	Terminal	Terminal	Merkezi	Merkezi	Sub-terminal	Merkezi	Terminal
% 7'lik NaCl içerisinde gelişim	–	–	–	+	+	–	+	–
Nitrati nitrite indirgeme	+	D	+	+	+	D n	–	–
Kazein hidrolizi	–	+	D	+	+	D	+	Z
Jelatin hidrolizi	–	+	D	+	+	D	+	–
Nişasta hidrolizi	+	D	D	+	+	+	–	–

*+; Var, -; Yok, D; Değişken, Z; Zayıf

Sütün işlendiği ortamlardaki bakteri kontaminantları olarak çoğunlukla patojen mikroorganizmalar üzerinde durulmasına karşın, termofilik basillerin sporlarının ve vejetatif formlarının da patojenlerle bir arada bulunma ihtimali, sporların uygun koşullarda çimlenerek yüzeylerde biyofilm oluşturabilmeleri, ürünlerin oksidasyon-redüksiyon potansiyellerini etkileyerek besin kalitesini düşürmeleri, gıda bozulmasına neden olan diğer mikroorganizmaların kendi oluşturdukları biyo-filmere tutunmasına imkan tanıyarak gelişmelerine destek olmaları nedeniyle, en az gıda patojenlerinin biyofilmlerinin yaratacağı riskler kadar sorun oluşturabilecekleri bilinmektedir (Flint vd. 2001a, Parkar vd. 2003, Rueckert vd. 2005, Burgess vd. 2009, Somerton vd. 2012, 2013, 2015).

Termofilik basiller, süt ve süt ürünlerinin, meyve sularının, glukoz şuruplarının yapımında kullanılan endüstriyel fermentörlerde, yüksek sıcaklıklara maruz kalmalarına karşın gelişebilmektedirler. Böylelikle bu fermentörlerin biyokorozyonuna ve bu tür ortamlarda istenmeyen bir mikrobiyel yükün oluşmasına neden olurlar. Biyokorozyon nedeniyle gıda işleme ünitelerinde kullanılan alet, ekipman ve yüzey malzemelerinin kullanım sürelerinin azalması önemli düzeyde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Süt endüstrisinde, en yaygın biyofilm izolatları termofilik streptokoklar ve termofilik basil üyelerini kapsar. Özellikle *A. flavithermus* ve *G. stearothermophilus* türleri, süt tozunda bulunan en yaygın termofilik kontaminantlar bilinmektedir. Termofilik basil biyofilmlerini, geniş sıcaklıktaki hızlı gelişim oranları, spor oluşturmaları ve sporların sıcaklığa dirençli olmaları sebebiyle, bu tür yüzeylerden gidermek oldukça zordur (Flint vd. 2001b, Parkar vd. 2003).

Sütün içeriğindeki organik materyallerin yüzeylerde birikmesi, bakterilerin buralara tutunmasına ve biyofilm geliştirmesine olanak tanımaktadır. Pastörizasyon birimlerinde organik materyal birikimine ve mikroorganizmanın bölünme hızına da bağlı olarak termofilik basiller, 12 saat içerisinde yüksek yoğunluklara (10^6 kob/mL) ulaşabilmektedir (Bouman vd. 1982, Bremer vd. 2009). Termofilik basil biyofilmlerinin gideriminde ürünün kısa sürede işlenmesinden ve rutin sanitasyon işlemlerinden dolayı tam bir başarı sağlanamamaktadır. Başarısızlığın diğer sebebi de termofilik basil biyofilm yapılarına ilişkin henüz yeterli bilginin bulunmayışıdır (Burgess vd. 2010).

Pastörizasyon modelleri uygulanarak gerçekleştirilen çalışmalarda, sütün florasında bulunan az sayıdaki (<100 termofil/mL) termofilik basilin ısıtma maruz kalması sonucunda pastörizasyon ünitelerinin soğutma kısımlarında hızla artabildiği tespit edilmiştir (Bouman vd. 1982). Isıl işlemlere maruz kalan termofilik basillerin dirençli sporları pastörizasyon sonrasında sütün kontaminasyonuna neden olarak ürünlerin raf ömürlerini kısaltmaktadır (Driessen vd. 1984). Az sayıdaki termofilik basil 20-30 dakikalık kısa ısıtma süreçlerinde vejetatif hale geçebilmekte ve sayıları 10^6 /hücreye ulaşabilmektedir. Araştırmacılar, artışın termofilik basillerin işlem ünitelerinin yüzeylerinde daha önceden var olan ve giderilemeyen biyofilmlerle ilişkili olduğunu kanıtlamışlardır (Scott vd. 2007). Termofilik basillerin biyofilmlerine ultrafiltrasyon ve ters ozmoz membranlarında da rastlanmaktadır (Tang vd. 2009a, b, 2010). Bu membranların, biyofilmler tarafından kapatılması, sütün akışını kısıtlamakta ve bu da rutin sanitasyon işlemlerine mali bir yük getirmektedir (Liao vd. 2004).

2.4.1 Termofilik basillerin neden oldukları gıda bozulmaları

Daha öncede bahsedildiği üzere, zorunlu ve fakültatif termofilik basiller asit ve çeşitli proteinaz-lipazları da içeren ısı-stabil enzimler üreterek gıdalarda bozulmaya neden olmaktadır (Basappa 1974, Chopra ve Mathur 1984, Cosentino vd. 1997, Chen vd. 2004, Gundogan ve Arik 2004, Murugan ve Villi 2009). Süt ürünlerinin genellikle 37 °C'nin altındaki sıcaklıklarda muhafaza edilmesinden ötürü zorunlu termofillerin bu sıcaklıklarda süt ürünlerinde bozulmalara neden olması düşük bir ihtimaldir. Mezofilik sıcaklıklarda *B. licheniformis*'in de dahil olduğu bazı fakültatif termofiller yapışkan hücre dışı bileşenler üreterek pastörize süt ve kaymağın kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Gilmour ve Rowe 1990). *B. subtilis* UHT sütlerde bozulmalarına neden olduğu gibi çiğ ve pastörize sütlerde de sünmeye neden olmaktadır (Heyndrickx ve Scheldeman 2002). *B. coagulans*'ta UHT (ultra yüksek sıcaklık) sütlerin ve konserve süt ürünlerinin laktik asit üretimiyle bozulmasında etken diğer türlerden biridir (Gilmour ve Rowe 1990). Zorunlu termofillerin patojenik olmadığı bilinmektedir. Ancak *B. licheniformis*, *B. pumilis* ve *B. subtilis* gibi bazı fakültatif termofiller mezofilik sıcaklıklarda nadir de olsa toksinler üretebilmektedirler (Oh ve Cox 2009, De Jonghe vd. 2010). Bazı nadir durumlarda, bu üç mikroorganizmaya gıda zehirlenmeleriyle

ilişkili tablolarda karşılaşılmaktadır (Griffiths 1995, Pavic vd. 2005). *G. stearothermophilus* konserve gıdalarda ve koyulaştırılmış süt gibi gıdalarda düz ekşimeye neden olmaktadır (Kalogridou-Vassiliadou 1992).

Fakültatif termofiller dışında, süt ve süt ürünleri endüstrisinde biyofilm üretimleri itibariyle risk teşkil eden grup termofilik basillerdir (Burgess vd. 2010). Süt ürünlerinin üretimindeki ön ısıtma ve buharlaştırma işlemlerindeki sıcaklıkların, bu bakterilerin gelişimi için ideal olması (45-65 °C) ilgili sorunun başlıca nedenidir (Murphy vd. 1999, Scott vd. 2007). *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin, patojen olmamalarına karşın, süt ürünlerinin işlendiği ünitelerden sıklıkla izole edilmesi durumu, söz konusu ortamlarda düşük hijyen koşullarının olduğunu göstermektedir (Chopra ve Mathur 1984, Chen vd. 2003). Söz konusu bakterilerin enzimatik faaliyetleri ve biyofilm sistemleri içerisinde uzun süre var olmaları, sürekli kontaminasyon kaynağı olarak risk oluşturma potansiyellerini arttırmaktadır. Bu bakteriler iyi birer biyofilm üreticisi olmakla beraber aynı zamanda yüksek düzeyde amilolitik, proteolitik ve glukozidik aktivitelere sahiplerdir (Cihan vd. 2009, 2011a,b, 2012b). Dolayısıyla, termofilik basiller bakteriler hem enzimatik faaliyetleri ile hem de biyofilm üretim kapasiteleriyle ekonomik anlamda önemli sorunlar doğurmaktadır.

2.5 Hijyen İndikatörleri Olarak Termofilik Basiller

Süt tozu gibi işlenmiş süt ürünlerinin içerisinde termofilik basillerin yüksek düzeyde bulunması ($> 10^4$ kob/g) düşük hijyen kalitesine işaret etmektedir. Termofilik kontaminantların süt endüstrisindeki süreçlere dahil olması ilkin endüstri birimlerine transfer edilen çiğ sütler içerisindeki endosporlarla mümkün olmaktadır. Çiğ süt sağım aşamalarında sağım ekipmanlarında ve bu işte çalışan personelde bulunabilecek kontaminantlarla ve özellikle çiğ sütün toprakla ve hayvan dışkıyla temas etmesi sonucunda çiğ süt hızlı bir şekilde kontamine olabilmektedir. Termofilik basiller toprak ve su kaynaklı olduklarından, sütün işlenme öncesinde ve sonrasında, sporlarıyla ortamı kontamine etmektedirler. Ancak çiğ sütün kalitesi işlendikten sonra elde edilen son ürünlerin içerisindeki termofil yüküyle ilişkili bir durum değildir (Muir vd. 1986). Esasında, çiğ süt içerisindeki termofil sayısı genellikle çok düşük düzeydedir

(<10 kob/mL) Hill ve Smythe 1994, McGuiggan vd. 2002). Nadir durumlarda, bu düzey *B. coagulans* ve *B. licheniformis* gibi türlerin varlığında yükselebilmektedir (>100 kob/mL). Ancak sütün işlenmesi neticesinde geçirilen ısıl işlemlere bağlı olarak son ürün içerisinde bu türlerden farklı olarak daha fazla düzeyde *A. flavithermus* ve *Geobacillus* türleri saptanmaktadır. Çiğ süt içerisindeki başlangıçta bulunan düşük sayıdaki termofil sporları, işlenmiş süt ürünleri içerisinde bulunan yüksek sayıdaki termofil sporlarının sayısını (10^4 – 10^6 kob/g) tek başına açıklamakta yetersizdir. Spor sayısındaki bu artış ancak ürünlerin işlendiği ünitelerde mevcut bulunan ve sürekli kontaminasyonların kaynağını teşkil eden kalıcı biyofilm yapılarıyla açıklanabilir. Hatta son ürün içerisinde bulunan spor sayısı ürünün işlenme süresindeki artışa bağlı olarak daha da kritik düzeylere çıkabilmektedir (Flint vd. 1997).

2.6 Termofilik basillerin endosporları

Sporulasyon, bazı bakteri gruplarında gelişme döngüsünün doğal bir parçasıdır. Sporulasyon bir hayatta kalma mekanizması olup, çeşitli stres koşulları altında meydana gelmektedir. Süt endüstrisindeki çevrelerde termofilik basillerin endospor oluşumu, hızlı bir şekilde meydana gelmektedir fakat; bu sürece dahil olan faktörler henüz net bir şekilde anlaşılmamıştır. Bu konudaki çalışmaların önemli bir kısmı mezofilik *B. cereus* ve *B. subtilis* üzerine yoğunlaşmaktadır. Termofilik basillerin sporları, onların eliminasyonlarını kısıtlayan en önemli faktördür. *Geobacillus* endosporları ultra yüksek sıcaklık uygulamalarına (134-145 °C’de 1-10 sn) dahi dayanabilmektedir (Hill 2004). Mandıra ünitelerinde termofilik basil biyofilmleriyle ilişkili süreçler henüz tam netlik kazanmamıştır. Az sayıdaki bazı çalışmalarda, termofilik basillerin çimlenen hücrelerinin ve sporlarının eş zamanlı olarak paslanmaz çelik yüzeylere tutunarak biyofilm ürettikleri saptanmıştır (Seale vd. 2008, Burgess vd. 2009). Sporların vejetatif hücrelere nispeten abiyotik yüzeylere tutunma eğilimi daha fazladır. Burgess vd. (2009) *Anoxybacillus* biyofilmlerinde spor oluşum oranını ve sıcaklığın etkisini incelemiştir. Yağsız süt içerisinde *Anoxybacillus* biyofilm gelişimleri için kullandıkları biyoreaktörde 6-8 saat arasında paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluştuğu gözlenmiştir. 48°C’de endospor oluşumu gözlenmemiş ancak, biyofilm oluşumunda bir azalma görülmüştür. 55 ve 60 °C’de ise biyofilmin % 10-50’si kadarının endosporlardan oluştuğu

görülmüştür. Sonuçta, *A. flavithermus*'da biyofilm oluşumu ve spor oluşumu hızının beraberce işleyen bir süreç olduğu ve sıcaklık artışının biyofilm sistemleri içerisinde endospor oluşumunda önemli etkisi olduğu saptanmıştır. Bu süreç dikkate alındığında sporulasyon ve biyofilm üretiminin eş zamanlı olarak devam ettiği düşünülmektedir (Burgess vd. 2009).

Bacillaceae familyası üyelerince oluşturulan sporlar, diğer adıyla da protoplast olarak bilinen ve genetik materyali içeren kordan ve bu kor kısmını çevreleyen kortikal membrandan ve korteksten oluşmaktadır. Tüm bu yapıların en dışında spor ceketini bulmaktadır. *Geobacillus* spp. ve *B. cereus* gibi bazı türler ekzosporium adı verilen spor ceketinin üzerinde bir dış katman daha bulundurmaktadır (Ellar 1966, Seale 2009) ve *B. cereus* gibi türlerde apendiksler bulunmaktadır (Ankolekar ve Labba 2010). Türler arasında spor yapısındaki farklılıkları belirleyen en önemli unsur spor ceketlerindeki katman sayısıdır ancak; genelde korteks ve kor çok fazla benzerlik göstermektedir (Aronson ve Fitzjames 1976, Atrih ve Foster 2001, Tipper ve Gauthier 1972). Örneğin, birçok spor iç ve dış ceket içermektedir. Ancak, diğer sporlar ekzosporla çevrili yoğun bir ceket içermektedir (Ellar 1966, Vinter 1969).

2.6.1 Spor oluşumu

Sporulasyon birçok basamaktan oluşan karmaşık bir süreçtir. Bu süreç aerobik ve fakültatif anaerobik spor oluşturan bakterilerde oldukça benzerdir (Ellar 1966, Palop vd. 1999). Süt endüstrisinde neden olabilecekleri sorunları anlamak adına spor oluşturan türlerin sporulasyon mekanizmalarını anlamak önem arz etmektedir. Mezofillerde, sporulasyon en başta açlık stresiyle, yüksek hücre yoğunluğuyla ya da DNA hasarıyla tetiklenmektedir (Cooney ve Freese 1976, Russell 1982). Aslında sporulasyon, erken safhalarda kültür besinsel açıdan zengin yeni bir çevreye taşınırsa geri döndürülebilmektedir (Greene ve Slepecky 1972, Cooney ve Freese 1976). Genel olarak, spor oluşumu için ideal sıcaklık ve pH değerleri vejetatif hücre gelişimi için gereken koşullarla benzerlik gösterse de sporulasyon için gereksinim duyulan sıcaklık ve pH değerlerinin skalası daha dar aralıktadır (Russell 1982). Süt endüstrisi çevrelerinde bulunan termofilik bakterilerin spor oluşumlarını tetikleyen faktörler henüz

yeterince anlaşılammıştır. Magnezyum, kalsiyum ve potasyum gibi minerallerin varlığı bu süreçte önemli roller sergilemektedir. Bu mineraller, olgun spor gelişimi için önemli olmakla birlikte spor oluşum süreçlerini de teşvik etmektedir (Vinter 1969). Kalsiyum, spor oluşumunun başlangıcında kor içerisinde birikmektedir (Johnstone vd. 1980, Palop vd. 1999). Kalsiyum aynı zamanda sporulasyon sürecini başlatan genlerin ifadelerinde de artışa neden olmaktadır (Oomes vd. 2009). Mineral tuzları sporulasyon besiyerlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Cooney ve Freese 1976, Kaul ve Singh 1982, Warriner ve Waites 1999). Bu mineraller süt ürünleri içerisinde de bulunduğu için termofilik basillerin sporulasyonu teşvik edilebilmektedir (Holt 1985). Bu kanıt, süt içerisine ilave bazı minerallerin bulunduğu süt içerisinde de gelişen *Geobacillus* cinsi üyeleri için laboratuvar ölçekli bazı çalışmalarda sunulmuştur (Seale vd. 2008). Ancak, termofilik basillerde başarılı bir spor formasyonu için gereken süre, cinsler ve türler arasında çeşitlilik göstermektedir. Örneğin; bazı termofilik basiller mineral katkılı sporulasyon besiyerleri içerisinde bir haftada tamamen sporlanırken, bazı *Geobacillus* izolatları mineral katkılı (CaCl_2 , MnSO_4 , FeSO_4 ya da MgCl_2) standart Triptik Soy Broth (TSB) içerisinde 12 ila 18 saatte ciddi oranda sporlanabilmektedir (10^5 - 10^7 spor/mL), (Seale vd. 2008).

2.6.2 Endospor direnci

Sporlar, ısıya, mekanik parçalamaya ve birçok kimysala karşı dirençlidir. Bu özellikleri süt endüstrisinde elimine edilmelerini oldukça güçleştirmektedir (Chandler vd. 2001, Cortezzo ve Setlow 2005, Jones vd. 2005, Scheldeman vd. 2006). Mezofilik ve fakültatif termofilik basillerin sporlarında düşük su içeriği, iç zarın geçirgenizliği, spor ceketinin varlığı, peptidoglikan korteks, küçük asitte çözünür proteinler ve dipikolinik asit (DPA) üretimleri gibi nitelikler direnci arttırmaktadır (Nicholson vd. 2000, Driks 2002, Cortezzo vd. 2004, Cortezzo ve Setlow 2005, Setlow 2005, 2006). Sporlardaki ısı dirence en büyük katkıyı mineralizasyon ve düşük su aktivitesi sağlamaktadır (Beaman vd. 1982). Spor korunda bulunan divalan katyonlar DPA'yı şelatlarlar. DPA'yı en çok şelatlayan katyon Ca^{2+} 'dir (Setlow 2005). DPA üremeyen mutant sporlar korda kalsiyum biriktiremezler (Hintze ve Nicholson 2010). Spor korunda bulunan divalan katyonların tipi ısı direnci doğrudan etkilemektedir. Örneğin; kalsiyum

ve magnezyum içeren agar besiyerleri üzerinde üretilen *B. subtilis*, *B. coagulans* ve *B. licheniformis* sporları yalnızca manganez içeren besiyerlerinde geliştirilen sporlar nispeten ısıya daha da dirençlidir (Cazemier vd. 2001). Su aktivitesi de yine aynı şekilde spor direncinde önemli bir kriterdir. Örneğin; *B. sporothermodurans*'ın UHT süttten izole edilen sporları, ham süttten izole edilen sporlarına nispeten daha yoğun, daha küçük ve ısıya daha fazla dirençlidir (Scheldeman vd. 2006). Konuya ilişkin bir diğer fenomen, artan ısı stresinde oluşan sporların optimum gelişme sıcaklıklarında gelişen sporlara nispeten daha dirençli olabildiğidir (Beaman ve Gerhardt 1986, Etoa ve Michiels 1988, Palop vd. 1999, Sang ve Sim 2006). Termofilik basillerde, sporlar ısıl dirençleri itibariyle çeşitlilik göstermektedir (Çizelge 2.3).



Çizelge 2.3 Bazı termofilik basil sporlarının ısı direnç profilleri

Türler	Suşların kökeni	Deneysel koşullar				Sıcaklık	Hayatta kalma	Referanslar
		Kesikli/Akış	Ekipman	İnokülasyon metodu				
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	Referans koleksiyonu	Kesikli	Paslanmaz çelik tüpler	Ringer solüsyonu içerisinde	121 °C	D-değeri 42 s	Dogan vd. 2009	
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	Referans koleksiyonu	Akış	Isı değiştirici	Ringer solüsyonu içerisinde	121 °C	D-value 7.3 s	Dogan vd. 2009	
<i>Geobacillus</i> spp.	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Doğal olarak kontamine edilmiş rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Evet, 6.4–7.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>Geobacillus</i> sp.	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Hayır, yaklaşık olarak 9 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>A. flavithermus</i>	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Doğal olarak kontamine edilmiş rekombine süt tozu	143 °C, 4 s	Hayır, 9.5–12 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>B. licheniformis</i> NCTC6346	Referans koleksiyonu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	120 °C, 3 s	Hayır, 9 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>B. licheniformis</i>	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	125 °C, 4 s	Hayır, 8.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>B. licheniformis</i>	UHT puding	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri verilmemiş	Mostert vd. 1979	
<i>B. subtilis</i>	Süt tozu	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış rekombine süt tozu	120 °C, 4 s	Hayır, 7–10.5 log ölüm	Schwarzenbach ve Hill 1999	
<i>B. subtilis</i>	UHT süt	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri verilmemiş	Mostert vd. 1979	
<i>B. pumilus</i>	UHT süt	Kesikli	Kapiler tüpler	Laboratuvarda hazırlanmış sporlar	135 °C, 10 s	Evet, log ölüm ya da D-değeri verilmemiş	Mostert vd. 1979	
<i>B. sporothermodurans</i>	UHT süt	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış, çiğ süt	125 °C, 5 s	Evet, D-değeri 13 dk	Scheldeman vd. 2006	
<i>B. sporothermodurans</i>	Çiğ süt	Akış	UHT pilot ünite	Laboratuvarda hazırlanmış, çiğ süt	125 °C, 5 s	Evet, D-değeri 2 dk	Scheldeman vd. 2006)	

UHT uygulamalarında sadece *Geobacillus* cinsine üye termofilik basillerin hayatta kalma potansiyeli görülmektedir (134-145 °C, 1-10 sn). Test edilen *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarının sıcaklığa karşı logaritmik azalma grafiklerinden elde edilen tahminlere göre > 10 logaritmik spor azalması 140 °C’de 4 saniyede gerçekleşebilmektedir (Schwarzenbach ve Hill 1999). Mostert vd. (1979) *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. pumilus* sporlarının 135 °C’de 10 saniye dayandıkları rapor edilmiştir. Daha güncel başka bir çalışmada ise süttten izole edilen birçok *Bacillus* izolatında (*B. licheniformis*’i de kapsayacak şekilde) 120 °C’nin üzerindeki sıcaklık uygulamalarına yalnızca *B. sporothermodurans*’ın sporlarının dayandığı rapor edilmiştir (Scheldeman vd. 2006). Laboratuvar denemelerinden elde edilen bulgulardan hareketle bir basilin sporunun sıcaklık direncini kestirmek çok da kolay olmamaktadır. Zira sporun bulunduğu ortam dahilinde, pH ve besiyeri kompozisyonu başta olmak üzere birçok faktör, sporların sıcaklığa karşı olan dirençliliğini etkileyebilmektedir. Örneğin süt içerisinde gelişen termofilik basil sporları laboratuvar sıcaklığa karşı koşullarında besiyerlerinde üretilen sporlarından çok daha dirençlidir (Hill 2004).

Süt tozu üreticileri için “ısı dirençli (80-100 °C, 10 ila 30 dakika)” ve “yüksek ısı dirençli (> 106 °C, 30 dakika)” termofilik basillerin endosporları, çok büyük bir sorun teşkil etmektedir. Zira daha sonra başka ürünlerin işlenmesinde kullanılmak üzere üretilen süt tozu, UHT ürünleri (*Geobacillus* ve fakültatif termofilik *B. sporothermodurans* sporlarının örneğinde olduğu üzere; 140 °C’de yaklaşık 3 saniye hayatta kalabilmektedir) ve damıtılmış ürünlerde (110-120 °C 15-20 dakika) devam eden kontaminasyonların kaynağını teşkil etmektedir (Hill 2004, Scheldman vd. 2006). *Geobacillus* türleri gibi, *B. sporothermodurans* da süt endüstrisindeki çevrelerde bulunabilmektedir. Örneğin; UHT ürünlerin işlendiği ünitelerdeki geri dönüşüm noktalardan, *Geobacillus* ve *B. sporothermodurans* suşları izole edilmiştir (Hammer vd. 1996, Petterson vd. 1996). *Bacillus* sporları süt tozu içerisinde çimlenme için uygun koşullar sağlanmadığı takdirde ise çok uzun yıllar dormant halde kalabilmektedir (Brosius vd. 1978). Örneğin; *B. subtilis*’in ve *B. licheniformis*’in canlı sporları 90 yıllık bir süt tozundan izole edilebilmiştir (Ronimus vd. 2006).

2.6.3 Endosporların vejetasyonu

Bir sporun vejetatif forma dönüşünü açıklayan üç süreç vardır. Bunlar; aktivasyon, germinasyon ve aşırı büyüme süreçleridir (Russell 1982). Spor aktivasyon mekanizması henüz net bir şekilde anlaşılamamıştır. Ancak, sporların germinasyon meydana gelmeden önce aktive olduğu genel olarak kabul görmektedir. Sıcaklık, kimyasallar ve pH düşüşü (pH 2-3) gibi faktörler sporları aktive edebilmektedir (Kim ve Foegeding 1990, Iciek vd. 2006, Vries 2006, Ghosh vd. 2009). Süt endüstrisinde, ürünlerin işlendiği süreçlerde meydana gelen sıcaklık artışları termofilik basillerin sporlarının aktivasyonundaki en önemli faktördür. Sıcaklık artışına bağlı olarak meydana gelen spor aktivasyonu suşa ve türe özgü olarak değişebilmektedir (Finley ve Fields 1961, Leuschner ve Lillford 1999). “Süper dormant” sporlar aktivasyon için görece düşük sıcaklıklara gereksinim duyan mezofilik türlerin sporlarına nispeten çok daha yüksek sıcaklıklara gereksinim duymaktadır (Ghosh vd. 2009).

Mezofilik sporların aktivasyonunu takiben, germinasyon bu sporlarda germinasyon reseptörlerine bağlanan besinsel bileşenlerle ya da yüksek basınç, tuzluluk ve lizozim gibi diğer çevresel faktörlerle devam ettirilmektedir (örneğin; l-alanin), (Setlow 2003). Bu süreç termofilik basillerde çok az anlaşılmış durumdadır.

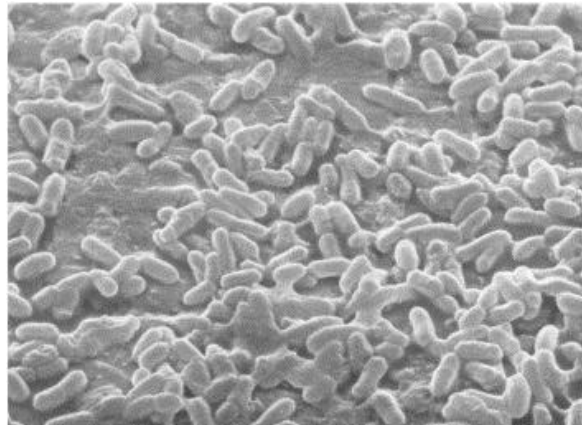
2.7 Süt ve Süt Ürünlerinin İşlendiği Süreçlerde Termofilik Biyofilmler

Mikroorganizmalar çeşitli yüzeylere tutunarak tıbbi, denizel, tatlı su ve içme suyu suyu şebekesi gibi çevrelerde biyofilm üretebildikleri gibi gıda üretim işletmelerinin çevrelerinde de biyofilm üretebilmektedir (Flint vd. 1997).

Biyofilm üretimi basamaklarında mikroorganizmalar ilk olarak abiyotik bir substrata tutunur. Bu aşamada ilk etapta geri dönüşümlü bir tutunma gerçekleşir. Geri dönüşümlü tutunmayı çevresel sinyallerdeki değişime bağlı olarak geri dönüşümsüz tutunma süreci takip eder. Geri dönüşümsüz tutunma sonrasında ise mikroorganizmalar hücre dışı ortama kendi ürettikleri polimerik bileşenleri salgılar ve mikrokolonizasyonu başlatırlar.

Bu mikrokoloniler genişler, büyür ve matriks adı verilen hücre dış polimerik bileşenlere gömülerek çok katmanlı olgun biyofilm yapılarını oluşturur (Stoodley vd. 1999, Stoodley vd. 2002, Johnston vd. 2004). Hücre dışı ortama salınan polimerik bileşenler, besinsel kriz artışı durumlarında biyofilm içerisindeki hücrelere besinsel takviye sağlarlar. Matriks yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar, planktonik akranlarına nispeten zorlu çevresel koşullara karşı çok daha dirençlidir.

Biyofilm oluşum süreci en başta çevresel koşullar olmak üzere mikroorganizmanın türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Bazı çevresel koşullar mikroorganizmaların bir substrata tutunarak çok katmanlı biyofilm yapıları üretmelerine imkan tanımayabilir. Termofilik basillerin ürettikleri biyofilmler “proses biyofilmleri” olarak tanımlanmaktadır (Flint vd. 1997). Proses biyofilmleri genelde tek bir tütün baskın olduğu biyofilm sistemleri için geçerli bir tanımdır. Süt endüstrisi çevrelerindeki özgül seçici baskılar, bu tip biyofilmlerin gelişmesi için uygun olabilmektedir. Söz konusu seçici baskıyı oluşturan koşullara, süt ürünlerinin besinsel kompozisyonları, pH'sı ve su aktivitesi örnek verilebilir. Termofilik biyofilmlerin yapıları ve kompozisyonları henüz net bir şekilde aydınlatılamamıştır. Termofilik mikroorganizmalar süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde, iyi bilinen biyofilm yapılarından farklı olarak (su kanalları bulunan ve mikroorganizmaların matrikse gömülü vaziyette oluşturdukları çok katmanlı yapılar), genelde tek katmanlı tipik biyofilm yapıları oluşturur (Şekil 2.5), (Flint 2001a).



Şekil 2.5 A. flavithermus'un paslanmaz çelik yüzey üzerindeki 18 saatlik biyofilmi (Flint vd. 2001a)

Yukarıda bahsi geçen biyofilm yapılarına çoğunlukla, düzenli temizlenen, yüksek akış stresinin olduğu süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde rastlanmaktadır. Ancak bundan farklı olarak görece daha düşük akış stresinin olduğu buharlaştırıcıların dağıtım plakaları gibi noktalarda ise çok tabakalı ve daha kompleks biyofilm yapıları oluşabilmektedir. Termofilik basiller, oluşturdukları biyofilm yapıları ile ekstrem ortamlara normalden daha da dayanıklı olabilmektedir. Böylece, termal adaptasyonlarının sebebinin kısmi içsel termostabilite ve endospor oluşturabilme yetenekleri olduğu düşünülürken, asıl mekanizmanın biyofilm yapısı oluşturma özelliklerinden kaynaklandığı kanısı giderek artmaktadır (Marchand vd. 2012).

Termofilik biyofilmlerin özellikle ürünler işlenirken sıcaklığın yükseldiği noktalarda (40-65 °C) oluştuğu bilinmektedir. Süt tozu üretim birimlerindeki ön ısıtma ve buharlaştırma bölümlerinde, pastörizasyon sürecinde kullanılan ısı değiştirici bölümlerde ve santrifüj seperatörlerinde (kremanın tam yağlı süttten ayrıştırılması sağlanır) söz konusu sıcaklıklara ulaşılabilir. Ayrıca yağ üretim birimlerindeki geri dönüşüm bölümlerinde, susuz süt yağı üretiminde kullanılan krema ısıtıcılarında sıcaklık yine yaklaşık 50 °C civarında seyretmektedir. Süt ürünlerinin işlendiği süreçte sıcaklığın yükseldiği ünitelerde termofilik biyofilmler mikrobiyal popülasyonda baskın hale gelmekte ve hızla biyofilm üretebilmektedir. Çiğ süt içerisinde neredeyse saptanamayacak düzeyde olan termofilik basiller, sıcaklığın yükseldiği bu noktalarda hızla gelişebilmekte ve bunun sonucunda da biyofilm yapıları oluşturabilmektedir (Staudhouders vd. 1982, Flint vd. 1997, Murphy vd. 1999, Warnecke 2001, Scott vd. 2007).

Mandıra işleme ünitelerinde biyofilmler iki kategoriye ayrılmaktadır: **viz- biyofilmleri** denen ve sadece mandıra işleme ünitelerine özgü olan biyofilmler. **İşlem biyofilmleri** olarak da bilinen bu biyofilmlere ürünün temas ettiği ısı eşanjörü gibi birimlerde rastlanmaktadır. **Süreç biyofilmleri** dışında gıda çevrelerinde rastlanan biyofilmlerde mandıra ürünlerinin işlendiği çevrelerde görülmektedir. Mandıra işleme ünitelerindeki süreç biyofilmlerinin diğer gıda çevrelerindeki biyofilmlerden birçok farklı yönü bulunmaktadır. Süreç biyofilmlerinde genelde tek bir tür baskın haldedir (Hup ve Stadhuuders 1979, Bouman vd. 1982). Süreç biyofilmlerinde tek bir türün baskın hale

gelmesinin nedeni, pastörizasyon gibi ısıya duyarlı Gram-negatif türlerin gelişimini inhibe eden ve süt içinde sıklıkla bulunabilen *Streptococcus thermophilus* gibi termodurik türlerin gelişimini aktive eden ısıl işlemlerin sonucudur. Süreç biyofilmleri çok kısa sürede gelişmeleriyle (pastörizörün rejenerasyon biriminde 12 saatlik süreçte 10^6 bakteri/cm²) karakterize edilmektedir (Bouman vd. 1982). Biyofilmler, herhangi bir yüzeyin sulu bir çevreye teması sonucunda kolaylıkla gelişebilmektedir. Biyofilmlerin tutunma fazında, süt içindeki proteinlerin denatüre olarak yüzeylerde oluşturduğu katman önemlidir (Kirtley ve McGuire 1989). Ancak bazı çalışmalarda, bakterilerin yüzeylere tutunup biyofilm üretebilmesi için denatüre süt proteinlerinin oluşturduğu bu katmanlara gereksinim duyulmadığı saptanmıştır.

Mandıra çevrelerinde bulunan bakteriler, kauçuk conta ve paslanmaz çelik yüzeyler gibi yerlere kolaylıkla tutunabilmektedir (Austin ve Bergerson 1995). Bu bakterilerin tutunmasını ve biyofilm oluşturmalarını etkileyen faktörler içerisinde; bakterinin gelişme fazı, bakterinin canlılığı, bakterinin yüzeyle temas süresi, ortam sıcaklığı, yüzey pürüzlülüğü, süt konsantrasyonu, akış hızı ve hidrofobisite ile yük gibi yüzey karakteristiklerine bağlı faktörler bulunmaktadır (Langeveld vd. 1972, Hup vd. 1979, Bouman vd. 1982, Hoffman 1983, Speers ve Gilmour 1985, Czechowski 1990, van der Mei vd. 1993). Yüzey topoğrafisi ve bakteriyal tutunma arasındaki ilişkiye yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur (Masurovsky ve Jordan 1958, Langeveld vd. 1972, Hoffman 1983, Mafu vd. 1990, Pedersen 1990, Leclercq-Perlat ve Lalande 1994, Wirtanen vd. 1995). Bakteriyal tutunmayı etkileyen ve gıda çevrelerinde kullanılan malzemelerin yüzey topoğrafisi, gıda işleme standartlarını belirleyen ve düzenleyen birimler tarafından titizlikle ele alınmaktadır. Örneğin; “US 3-A-Sanitary Standard 01-07 (1990)” standardına göre kullanılacak olan yüzeylerin karakteristiği No 4 düzeyinde olmalıdır (yüzeyler 150 grid’lik silikonlarla rodajlanmaktadır). Bir başka örnek vermek gerekirse, mandıra endüstrisinde kullanılan yüzeylerde 0.8 µm (R_a) düzeyinden yüksek düzeyde pürüzlülüğe izin verilmemektedir (DIN 11480-1978). Bazı araştırmacıların bulgularına göre artan yüzey pürüzlülüğüyle biyofilm üretimi arasında pozitif bir korelasyon bulunurken (Masurovsky ve Jordan 1958, Hoffman 1983, Pedersen 1990, Leclercq-Perlat ve Latande 1994, Wirtanen vd. 1995); bazı araştırmacılar, yüzey pürüzlülüğüyle bakteriyal tutunma arasında bir korelasyon bulmamıştır (Langeveli 1972,

Mafu vd. 1990, Vanhackle vd. 1990). Bakteriyal tutunma, mandıra işleme ünitelerinde sütün kompozisyonuna ve bakteriyal türe göre azalabilmekte ya da artabilmektedir. Örneğin birçok bakterinin tutunması çiğ sütte inhibe olurken, ilave laktoz içeren süt ürünlerinde ya da kazein içermeyen protein solüsyonları içerisinde bakteriyal tutunma artabilmektedir (Speers ve Gilmour 1985, Suarez vd. 1992, Cariado vd. 1994).

Sütün içeriğinde bulunan yağ kürecikleri ve doğal antikorlar bakteriyal tutunmayı engelleyebilmektedir. Süt örnekleri içerisindeki bulunabilecek bakteri türleri biyofilm gelişimini doğrudan etkileyen bir faktördür. Örneğin; pastörize süt içerisinde bulunabilen termodurik Streptokoklar ve *Bacillus* türleri çiğ süte nispeten daha fazla sayıda bulunabilmekte ve pastörize süt içerisinde biyofilm gelişimine neden olabilmektedir (Robinson 1990). Mandıra işleme ünitelerindeki biyofilmlerin doğasını ve gelişimini belirleyen birçok faktör bulunmaktadır. İşletmeye gelen sütün orijini, yaşı ve sıcaklığı gibi faktörler buna örnek verilebilir (Hup vd. 1979). Pastörizasyon sonrası aşamalarda gıda bozulmalarına neden olan psikotroflara (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Flavobacter*) rastlanması, işleme ve sanitasyon sürecinin yetersiz olduğuna ilişkin fikir vermektedir (Koutzayiotis 1992).

2.7.1 Vejetatif hücrelerin ve sporların tutunması

Termofilik basillerin biyofilm üretiminin ilk aşamasında hem vejetatif hücreler hem de sporlar bir substrata tutunur. Farklı termofilik basil türleriyle yapılan çalışmalarda spor yapılarının vejetatif hücre formlarına nispeten yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde olduğu gözlenmiştir ($6-7 \log_{10}$ spor/cm²; $6-7 \log_{10}$ hücre/cm²), (Parkar vd. 2001). Mikroorganizmaların yüzeylere tutunması çok faktörlü bir süreçtir. Örneğin; hücre yüzey proteinler bazı türlerde tutunmada çok önemli roller üstlenirken, bazı türlerde bu proteinlerin etkisi yoktur (Faille vd. 2007). Ortamdaki fizikokimyasal karakteristikler de sporların yüzeylere tutunmasında kritiktir. Bazı çalışmalarda, yüksek hidrofobisiteye sahip sporların yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde olduğu saptanmıştır (Ronner vd. 1990, Wiencek vd. 1990, Faille vd. 2002). Ancak söz konusu bulgulardan farklı olarak *Geobacillus* cinsi üyelerin sporlarıyla yapılan çalışmalarda hidrofilik

karakterdeki sporların paslanmaz çelik yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde olduğu saptanmıştır (Parker vd. 2001).

Yüzey proteinlerinin *A. flavithermus*'un vejetatif hücrelerinin paslanmaz çelik yüzeylere tutunmada önemli roller üstlendiği bilinmektedir. Yüzey proteinlerinin uzaklaştırılması paslanmaz çelik yüzeylere tutunma eğiliminde $1-\log_{10}$ 'luk bir azalmaya neden olmuştur. Daha sonrasında aynı suşun söz konusu yüzey proteininin üretimi itibariyle mutantı olan bakteriyle yapılan karşılaştırmadaa yine benzer şekilde mutantın paslanmaz çelik yüzeye tutunma eğiliminde azalma saptanmıştır (Palmer 2008). Yüzey proteinlerinin dışında termofilik basillerin hücre dışı polimerik bileşenlerinin diğer birçok mikroorganizmanın biyofilmlerindeki rollerinin aksine yüzeylere tutunmada çok da kritik olmadığı düşünülmektedir. Zira bu hücre dışı bileşenlerin uzaklaştırılması söz konusu termofilik basillerin paslanmaz çelik yüzeylere olan tutunma eğilimlerini değiştirmemiştir (Parker vd. 2001, Palmer 2008). Ancak bazı araştırmacılar da; karbohidrat gibi protein dışındaki matriks bileşenlerinin termofilik basillerin abiyotik yüzeylere olan tutunma eğilimini arttırdığına yönelik bulgular sunmuşlardır. Örneğin Kilic vd. (2017) tarafından termofilik bir *Aeribacillus* suşu ile yürütülen çalışmada, biyofilm matriksindeki yüksek karbohidrat içeriğinin suşun paslanmaz çelik ve polistiren gibi abiyotik yüzeylere tutunmasını kolaylaştırdığı saptanmıştır.

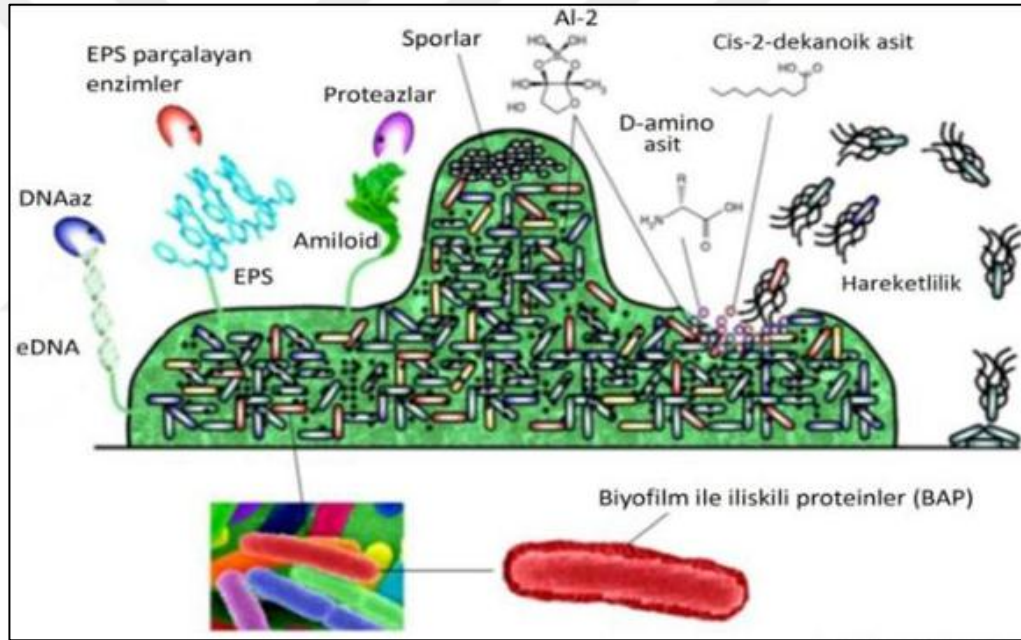
2.7.2 Tutunmuş vejetatif hücrelerin ve sporların gelişmesi

Tutunmayı takip eden süreçte, sporların çimlenerek vejetatif formlarını oluşturduğu ve bu vejetatif formların biyofilm yapılarını geliştirdiği kabul edilmektedir (Burgess vd. 2009). Ancak biyofilm üretiminin hem sporlar hem de vejetatif formdaki hücreler tarafından da başlatılıyor olması son derece muhtemeldir. Örneğin *A. flavithermus* ile yapılan bir çalışmada biyofilm üretimi hem sporlar hem de vejetatif hücreler tarafından başlatılmaktadır (Burgess vd. 2009). *A. flavithermus* biyofilmleri, laboratuvar koşullarında 114 saati aşan bir periyotta örneklendiğinde, biyofilm içerisindeki hücre yoğunluğu 2 ila 7 \log_{10} hücre/cm² arasında dalgalanmaktadır. Aynı çalışmada inoküle edilmeden hazır formuyla kullanılan pastörize süt örneklemelerinde (normal şartlarda pastörize süt içerisinde bulunabilecek termofil sayı < 1 hücre/mL) termofilik

biyofilmlerin gelişmesi için uygun koşulların sağlanması durumunda oluşan termofilik biyofilmler içerisindeki hücre yoğunluğu 18 saat içerisinde $6 \log_{10}$ hücre/cm² düzeyine çıkmıştır (Parkar vd. 2003).

2.7.3 Biyofilmler içerisindeki sporların gelişimi

İlk tutunmadaki etkin rollerinden farklı olarak gelişen bir termofilik biyofilm içerisinde hızla yeni sporlar da gelişmektedir. Örneğin *A. flavithermus* ile yapılan çalışmalarda, sürekli akış reaktöründe yürütülen biyofilm örneklemesinde biyofilm üretimi ve spor formasyonu eş zamanlı olarak gerçekleşmiştir (Burgess vd. 2009), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Termofilik biyofilm oluşumu ve biyofilmin yapısı (Abee vd. 2011).

Bu gözlem yine süt endüstrisinde önem arz eden mezofilik basiller ile yapılan çalışmalardaki gözlemlerden farklıdır. Zira benzer koşullarda mezofilik basillerde sporulasyon ve biyofilm üretimi ayrı zamanlarda gerçekleşmektedir. Örneğin; *B. subtilis* ile yapılan bir çalışmada planktonik kültür içerisinde sporulasyon 5. saatte saptanırken; biyofilm kültürü içerisinde 30. saatten itibaren saptanmıştır (Lindsay vd. 2005). Bilindiği üzere termofilik basillerdeki sporulasyon sürecinde inkübasyon sıcaklıklarındaki değişim en belirleyici faktörlerden biridir. Örneğin; 55 ve 60 °C’de

geliştirilen *A. flavithermus* biyofilmlerinde sporulasyon oranı 48 °C’de geliştirilen biyofilm örneklerine nispeten % 10 ila % 50 oranında artmaktadır (Burgess vd. 2009).

2.8 Süt Kompozisyonun ve Sütün İşlendiği Çevrelerin Termofilik Biyofilmlerin Gelişimindeki Rolü

Çiğ süt birçok mikroorganizmanın gelişebilmesine olanak sağlayan ideal bir besiyeridir. Çiğ sütün florası hem patojenik hem de gıda bozulmalarına neden olan mikroorganizmaları içermektedir. Sütün sağıldığı çiftliğin genel çevresel özellikleri, sütün depolandığı ortamlar, farklı sağma metotları ve çiğ sütün işleneceği üniteye kadar transfer edilmesinde kullanılan tankların nitelikleri gibi birçok etken sütün kontaminasyonuna neden olabilmektedir. Ürünlerin işlendiği çevrelerde biyofilm oluşumunu etkileyen en temel faktör, sütün içerdiği organik kalıntıların yüzeylerde birikmesidir. Temiz bir yüzey 5-10 saat gibi bir sürede süt ile temas etmesi halinde üzerinde organik materyaller fazlasıyla birikebilmektedir (Mittelman 1998). Yüzeylerin organik bileşenleriyle kaplanması yüzeyin serbest enerji düzeyini, hidrofobitesini ve elektrostatik özelliklerini etkileyebilmektedir (Dickson ve Koohmaraie 1989). 65 °C ve üzerindeki ısı uygulamalarda “whey” proteinlerinin (laktalbumin ve laktoglobulin) denatüre olması ve birikmesiyle paslanmaz çelik yüzeylerin karakteristiği değişmekte ve daha adeziv bir yüzey oluşabilmektedir (De Jong 1997). Bu yüzeylerde *G. stearothermophilus*’un vejetatif hücreleri ve sporları 10-100 kat daha fazla tutunabilmektedir (Flint vd. 2001b). Organik bileşenlerin yüzeylerdeki birikimi, yüzeyin yapıldığı malzeme ile doğrudan ilişkilidir.

Süt su, spesifik proteinler, yağlar, laktoz, mineraller ve vitaminlerden oluşan bir gıdadır. Sütün pH’sı nötral pH’ya yakındır (Jensen 1995). Kazein, serum albümini ve whey proteinleri süt içerisindeki başlıca proteinlerdir (Swaisgood 1995). Kazein miselleri, sütün akışkan kısmındaki en büyük yapılardır ve bu miseller toplam protein içeriğinin % 80’ine tekabül etmektedir (Jensen 1995). Kazein, sütün toplam içeriğinin ise ortalama % 3.3’üne (w/v) karşılık gelmektedir. En yoğun bulunan yağ içeriği triaçilgliseroldür (TAG). TAG 400’den fazla tipte yağ asiti içermektedir (Rudd 2013). Yağ komponenti yağ globülleri formunda salgılanmaktadır ve süt yağ globül membranı adı verilen

(MLGM) bir membran ile çevrilmektedir (Jensen 1995). Toplam yağ içeriği sütün ortalama % 3.4'üne (w/v) karşılık gelmektedir. Sütün karbohidrat içeriğine bakıldığında ise en yoğun karbohidrat tipinin laktoz (toplam içeriğin yaklaşık % 5.5'i) olduğu görülmektedir. Bu içeriği çok az miktarlarda glukoz ve galaktoz takip etmektedir (Newburg and Neubauer 1995). Sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum, sitrat, fosfat ve sülfat ise sütün içeriğindeki başlıca minerallerdir (Atkinson vd. 1995). İnek sütünün temel kompozisyonu ineğin laktasyon fazı, ırkı ve beslenme rejimi gibi faktörlerden fazlasıyla etkilenebilmektedir (Chandan ve Kilara 2010).

15 farklı bakteriyal kültürün farklı süt kompozisyonlarında cam, kauçuk ve paslanmaz çelik gibi farklı yüzeylerdeki tutunma paternlerini belirlemeye yönelik bir çalışmada, laktozun ve non-kazein (kazein olmayan) proteinlerin çalışılan bakterilerin bu üç yüzeye de tutunma eğilimini arttırdığı saptanmıştır (Speers ve Gilmour 1985). Başka bir çalışmada, sodyum, kalsiyum, magnezyum ve katyonik sülfektanların sütün işlendiği çevrelerde bazı birimlerde kullanılan ve negatif yüklü membran filtreleri nötralize ederek bakterilerin bu yüzeylere tutunmalarını kolaylaştırdığı saptanmıştır (Bellona ve Drewes 2005). *Listeria monocytogenes* ve *Serratia marcescens* gibi bakteriyal türlerin çalışıldığı başka bir çalışmada ise ferröz iyonların bu bakterilerin paslanmaz çelik yüzeylere olan tutunma eğilimini arttırdığı saptanmıştır (Barnes vd. 1999). Güncel bazı çalışmalarda yine divalan katyonların monovalan katyonlara olan oranının artmasının, yani divalan katyon konsantrasyonundaki artışın termofilik basillerin paslanmaz çelik yüzeylere olan tutunma eğilimini teşvik ettiği kanıtlanmıştır (Sommerton vd. 2012, 2013).

2.8.1 Organik bileşenlerin etkisi (proteinler ve lipitler)

Kirtley ve McGuire (1989) abiyotik yüzeylerde protein tabiatlı bir film tabakasının şekillenmesinin süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde biyofilm gelişimine davetiye çıkardığını bulgulamışlardır. Başta “whey” proteinleri olan laktoglobulin ve α -laktalbumin olmak üzere kazein olmayan süt proteinleri sütün doğal florasında bulunan mikroorganizmaların abiyotik yüzeylere tutunmalarını kolaylaştırmaktadır (Speers ve Gilmour 1985). Speers ve Gilmour'a (1985) göre kazein olmayan (non-kazein)

proteinlerin viskozitesi bakterilerin akümüle olmalarına imkan tanıyarak yüzeylere tutunmalarının yolunu açarak biyofilm oluşumunu başlatıcı bir etki oluşturmaktadır. Sütün protein bileşenlerinden farklı olarak yağ içeriğinin biyofilm oluşumuna olan etkileri değerlendirildiğinde, sütün kompozisyonundaki fosfolipitlerin etkin olduğu görülmektedir. Fosfolipitler sütün temas ettiği yüzeylerde ince sarı bir film tabakası oluşturmaktadır ve bu tabaka içerisinde gömülü vaziyette birçok mikroorganizma bulunmaktadır (Pasvolsky vd. 2014). Fosfolipitlerin bipolar doğası, bakterilerin paslanmaz çelik gibi yüzeylere tutunmalarını tetiklemektedir. Yağ asitleri, özellikle bütirik asit, sütün içerisindeki mikroorganizmaların mikrobiyal matlar halinde organize olmalarına kolaylık sağlamaktadır. *Bacillus* türleri ile yapılan bir çalışmada bu matlar içerisinde hapsolan bakteri sporları ve vejetatif formlar pastörizasyon işlemleriyle elimine edilememektedir (Pasvolsky vd. 2014). Bu hipotezi desteklemek adına farklı konsantrasyonlarda bütirik asit içeren (% 0,1-0,02) lizogeni sıvı besiyerlerinde geliştirilen *Bacillus* kültürlerinde artan bütirik asit konsantrasyonuna bağlı olarak daha fazla mikrobiyal mat oluşumu gözlenmiştir. Söz konusu bulgulara dayanarak bütirik asitin süt florasında bulunan *Bacillus* cinsine üye bakteriler için bir stres sinyali olabileceği ve bu strese maruz kalan bakterilerin korunabilmek adına mikrobiyal matlar içerisinde organize oldukları düşünülmektedir (Pasvolsky vd. 2014). İleri araştırmalar, bütirik asitin *Bacillus*'ta biyofilm üretimini teşvik eden *tapA* geninin ifadesini arttırdığını kanıtlamıştır (Vinkelman vd. 2013, Pasvolsky vd. 2014). Yine çiğ sütün doğal florasında bulunan ısıya dirençli ve lipolitik aktivite gösteren bakterilerin sütün içerisindeki yağları hidrolize etmeleri sonucunda açığa çıkan bütirik asit, bu bakterilerin biyofilm yanıtı geliştirmelerine neden olarak söz konusu stresten korunmalarını sağlamaktadır (Teh vd. 2013).

Sütün içerisindeki her bileşen bakterilerin yüzeylere tutunmalarını kolaylaştırmamaktadır. Örneğin; bir çalışmada süt tozu içeriği ile kaplanmış paslanmaz çelik yüzeylerde *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Serratia marcescens* gibi bakterilerin bu yüzeylere olan tutunma eğilimlerinde bir azalma saptanmıştır (Barnes vd. 1999). α - Kazein, β -Kazein ve κ - Kazein bileşenleriyle muamele edilmiş paslanmaz çelik yüzeylere olan bu bakterilerin tutunma eğilimi, bu bileşenlerle muamele edilmemiş paslanmaz çelik yüzeylere olan tutunma eğilimlerine oranla daha

az olmuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayarak, çalışılan bakterilerde bu tip kazeinlerin tutunmada önemli olan hidrofilik kısımları maskeleyiği ve yüzeye tutunma eğilimini azalttığı düşünülmektedir. α -Laktalbuminin söz konusu kazein bileşenlerinden farklı olarak yüzeye daha az tutunmakta, böylelikle bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde tutunmalarına imkan sağlayacak daha fazla alan kalmasına bağlı olarak, bakterilerin daha kolay bir şekilde tutunup biyofilm geliştirebildikleri bilinmektedir. Örneğin, sütün seyreltilmesiyle birlikte kazein konsantrasyonu azaltıldığında bakterilerin yüzeylere yine daha fazla tutunabildikleri saptanmıştır (Barnes 2001). Ancak, Speers ve Gilmour'a göre (1985) sütün içerisindeki yağ ve kazeininin, laktoz varlığı haricinde, bakteriyel tutunmada önemli olmadığı öngörülmektedir. Fletcher'a göre (1976) sütün içerisindeki BSA (bovin serum albümin), jelatin, fibrinojen ve pepsin gibi farklı proteinlerin yüzeye temas etmeleri sonucunda bakteriyel tutunmada bir azalma olmaktadır. Farklı çalışmalardan elde edilen birbirinden farklı bu bulgular, sütün varlığında meydana gelen mikrobiyal tutunmanın bakteri türüne göre çeşitlilik gösterebidiğini ve sütün bileşenlerinin yüzeye olan tutunmalarındaki yarışmanın söz konusu tutunma karakteristiklerini belirleyen başlıca faktör olduğunu düşündürmektedir. Yine Speers ve Gilmour'a göre (1985) bazı yağ globülleri ve doğal antikorlar bakterilerin yüzeylere tutunma eğilimini azaltan diğer faktörlerdendir. Brooks ve Seaman'a göre (1976) sütün içeriğindeki bazı proteinler, yüzeyin iyonik kondisyonunu modifiye ederek makromoleküler yapı iskeleleri oluşturmaktadır. Bu yapılar birçok bakterinin bu yüzeylere tutunmalarını güçleştirmektedir. Süt tozu, kreması alınmış süt ve yağ serumu ile kaplanmış yüzeylerde *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* ve *Lactobacillus casei* gibi bakterilerin tutunma eğiliminin azaldığı saptanmıştır (Dat vd. 2014). Barnes'e göre (2001) sütün içerisinde bulunan bakterilerin paslanmaz çelik yüzeylere tutunmalarını güçleştiren bileşenlerden oluşan bir karışım ile ürünlerin işlendiği çevrelerin ön muameleden geçirilmesi söz konusu bakterilerin neden olabileceği biyofilmlerle ilgili sorunları geçici olarak giderebilecek bir çözümdür.

Tam yağlı sütte bakteriyel tutunma yağsız süte nispeten daha fazladır. Denatüre proteinler içeren süt içerikleriyle ve denatüre olmamış protein içeren süt içeriklerinin mikrobiyal tutunmaya olan etkilerine bakıldığında, denatüre olmamış protein içeriğine

sahip tam yağlı süt bulunduran ortamlarda, bakterilerin daha fazla biyofilm üretebildikleri saptanmıştır (Marchand vd. 2012).

2.8.2 İyonların etkisi

Yeni Zelanda'daki, süt tozu üretim tesislerindeki gözlemlere dayanarak sodyum içeriğince yüksek, ancak kalsiyum ve magnezyum içeriğince düşük süt formülasyonlarının işlendiği birimlerde *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerinde azalma olduğu söylenebilmektedir (Somerton vd. 2012). Süt tozu üretim tesislerinde sıcaklığın yükseldiği birimlerde (40-60 °C) termofilik basillerin artışında patlama yaşanabilmektedir. Pratik çözümler geliştirebilmek adına Somerton vd. (2012) farklı konsantrasyonlarda monovalan (Na^+ , K^+) ve divalan (Ca^{2+} , Mg^{2+}) katyon içeren süt içeriklerini kullanarak *A. flavithermus* ve *Geobacillus* spp. türleriyle yaptıkları bir çalışmada, sütün katyonik bileşenlerinin bu basillerin biyofilm üretimlerine olan etkilerini test etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre katyonik bileşenlerin termofilik biyofilmlerin gelişimine olan etkilerini açıklamaya yönelik üç hipotez geliştirilmiştir. Buna göre minerallerin;

- 1) Katyon homeostazisindeki etkileri ve besinsel bileşenler olarak tercih edilip kullanılmaları,
- 2) Doğrudan kohezif kuvvetler üzerindeki elektrostatik etkileri (Bu etkiler bakterilerin kendi ürettikleri hücre dışı polimerik bileşenlerle olan etkileşimlerini ve paslanmaz çelik yüzeylerle olan etkileşimlerini doğrudan etkilemektedir).
- 3) Bakterilerin fizyolojileri ve metabolizmaları üzerindeki doğrudan etkileri.

Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi divalan katyonlar, *A. flavithermus* ve *Geobacillus* spp. gibi türlerin mikrobiyal gelişimine katkı sağlamaktadır (Somerton vd. 2012). Bu bakterilerin kültürlerindeki optik yoğunluk artışı yalnızca bakteriyel popülasyon yoğunluğunun artışına bağlı olmayıp, aynı zamanda yoğun miktarda üretilen yüzey proteinlerinin ve hücre dışı polisakkaritlerin varlığına da bağlıdır. *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsine

üye bakterilerin Ca^{2+} ve Mg^{2+} varlığında, yüzey proteinlerinin üretimindeki artış, bu bakterilerin farklı susbstratlara olan tutunma eğilimini de artırmaktadır (Somerton vd. 2013). Bu bulgular, divalan katyonların *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmlerindeki fizyolojik etkilerine yönelik ilk ve tek bulgudur. Yalnızca Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} katyonları içeren besiyerlerinde *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* bakterileri geliştirildiğinde optik yoğunlukta kayda değer bir azalma saptanmıştır ancak; ortama Mg^{2+} ilave edildiğinde mikrobiyal gelişimde yeniden bir artış sağlanmıştır. Bu durum katyon homeostazisi ile açıklanmaktadır ve magnezyum burada sodyum, potasyum ve kalsiyumun inhibe edici etkilerini tolere etmektedir. Bu bulgulara dayanarak, monovalan katyonların divalan katyonlara oranla konsantrasyonlarındaki artışın *Geobacillus*'un gelişimini inhibe edici bir etkisi olduğu söylenebilmekte ve bu durumun pratikte de uygulanabilirliğini gündeme getirmektedir. Sonuç olarak yüksek konsantrasyonda Mg^{2+} katyonunun bulunması, *Geobacillus* spp. ve *A. flavithermus*'ta mikrobiyal gelişimi tetiklemekte ve popülasyon yoğunluğundaki bu artış dolaylı olarak biyofilm üretimini de teşvik etmektedir (Somerton vd. 2013).

MALDI-TOF kütle spektroskopisi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi katyonların *Geobacillus* sp. F75 suşunun biyofilmi üzerindeki etkilerinin protein ifade düzeyindeki keşfi için kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, her bir katyonun biyofilm fizyolojisi üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada *Geobacillus* biyofilmlerinde fonksiyonel olduğu düşünülen bir proteinin, kültür ortamına Mg^{2+} katkısı ile ifadesinin arttığı bulgulanmıştır. Paralel şekilde ifadesi baskılanan beş proteinin de sporulasyondan sorumlu olan enzim ve proteinler olduğu saptanmıştır. Elde edilen yaklaşım itibariyle, Mg^{2+} katyonunun *Geobacillus*'ta sporulasyonu engellemesine ve hücre bölünmesini teşvik etmesine bağlı olarak biyofilm gelişimine katkı sağladığı söylenebilmektedir. Monovalan katyon oranının divalan katyon oranından fazla olduğu durumlarda sporulasyon tetiklenmekte ancak; hücre bölünmesindeki ve biyofilm üretimiyle ilişkili proteinlerin ifadelerindeki azalmalara bağlı olarak biyofilm üretimi zayıflamaktadır. Bu sonuçların ışığında, mevcut fenomenden hareketle yeni süt formülasyonlarının geliştirilmesi ve süt-süt ürünleri işleme ünitelerindeki son ürünlerin içerisindeki *Geobacillus* yükünün azaltılması kuvvetle muhtemeldir. Farklı *Geobacillus* ve *A. flavithermus* izolatları ile yapılan denemelerde erken safha biyofilmlerin (6-18

saat) oluşumunun monovalan katyon oranının, divalan katyon oranından yüksek olduğu durumlarda inhibe olduğu saptanmıştır. Söz konusu çalışma, farklı *Geobacillus* ve *A. flavithermus* izolatlarının biyofilmlerinin, çeşitli monovalan ve divalan katyonları içeren farklı süt formülasyonları tercih edilerek nasıl inhibe olabileceğini, 18 saatlik bir sürece tekabül eden tipik bir süt tozu üretiminde son ürün içerisinde termofilik basil yükünün nasıl azaltılabileceğini ve yüksek konsantrasyonda Na^+ katyonları, düşük konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve Mg^{2+} katyonları ile karakterize edilmiş süt formülasyonları içerisinde *Geobacillus* biyofilm fizyolojisinin nasıl değiştiğini açıklar mahiyettedir (Somerton vd. 2013). Divalan katyonlar ayrıca monovalan katyonların toksik etkilerini de azaltarak termofilik basillerin hayatta kalma olanaklarını arttırmaktadır. Benzer sonuç, biyofilm sistemlerinden farklı olarak planktonik termofilik basil kültürleriyle yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (Somerton vd. 2012). Yüksek monovalan ve düşük divalan katyon içeren süt formülasyonlarındaki elektrostatik etkilerin de *Geobacillus* biyofilmlerinin gelişimini inhibe ettiği düşünülmektedir. Katyonların, hücre yüzeylerinde ve biyofilm matriksinde bulunan polimerlerle olan elektrostatik etkileşimi hemen hemen tüm bakterilerde aynıdır (Neuhaus ve Baddiley 2003). Ancak ilişkili çalışmada *Geobacillus* biyofilmlerinin inhibisyonunun yüksek monovalan, düşük divalan katyon içeren formülasyonlardaki elektrostatik etkileşimlerle ilişkili olduğu düşünülmemektedir. İnhibisyonun, katyon homeostasisindeki dengesizlik ile ya da yüksek monovalan-düşük divalan konsantrasyonlarının termofilik basil biyofilmlerinin fizyolojisinde neden olduğu değişimler ile ilgili olduğu öne sürülmektedir. *Geobacillus* biyofilmlerindeki durumun aksine *A. flavithermus* biyofilmlerinde yüksek monovalan içeriğine sahip süt formülasyonlarında biyofilm gelişiminde bir inhibisyon gözlenmemiştir. *A. flavithermus* Na^+ gibi monovalan katyon içeriğinin yüksek olduğu içeriklerde toksisiteden *Geobacillus* izolatlarına göre daha az etkilenmektedir (Somerton vd. 2013).

2.8.3 Süt ve süt ürünlerinin işlendiği yüzeylerin etkisi

Bakteriyel adezyonda yüzeylerin pürüzlülük durumu kritiktir (Sreekumari vd. 2005, Oliviera vd. 2006). Kullanılan yüzeyler üzerinde az pürüz ve çatlak bulunması bakteriyel tutunmanın azaltılması ve etkin sanitasyonun gerçekleştirilebilmesi için

önemlidir (Bremer vd. 2009). Sütün fizikokimyasal içeriği de mikrobiyal adezyonu etkilemektedir.

Süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde kullanımı olan kauçuk ve paslanmaz çelik gibi süt ürünlerinin biriktiği yüzeylerde, bazı bakterilerin biyofilm üretebildikleri bilinmektedir (Czechowski 1990, Krysinski vd. 1992). Gıda kaynaklı hastalıklara ve gıda bozulmalarına neden olan bazı bakterilerin özellikle alüminyum, teflon ve naylon materyaller üzerinde birikip, biyofilm üretebildikleri rapor edilmiştir (Herald ve Zottola 1988, Mafu vd. 1990, Blackman ve Frank 1996).

Sütün işlendiği çevrelerde kullanılan malzemelerin mekanik karakteristikleri, ekspansiyon katsayısı, termal iletkenliği ve kolay kullanılabilir olması gibi özellikler tercih nedeni olarak göz önünde bulundurulabilmektedir (Bremer vd. 2009). Ürünlerinin işlendiği çevrelerde, paslanmaz çeliğin yerine başka bir malzemenin tercih edilmesi şu an için hala mümkün görünmemektedir. Yine de bazı tesislerde lastik ve plastik gibi alternatif malzemelerin kullanılmasına karşın, bu malzemeler kendi içerisinde kısıtlayıcı bazı özellikler de bulundurmaktadır. Lastik ve plastikten yapılan malzemeler taşıma bantları, konteynır, conta ve kesim yüzeyleri gibi yerlerde kullanılabilir. Bunların yanı sıra birçok plastik malzemenin de kullanım potansiyeli varken bunlardan ancak gıdalarla uyumlu olabilen polipropilen (PP), polikarbonat (PC), yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE), polivinil klorür (PVC) ve bir floropolimer olan politetrafloroetilen (PTFE, Teflon®) gibi birkaç tanesi kullanılabilir. Gıdaların işlendiği ünitelerde kullanılan malzemeler rutin sanitasyon ve dezenfeksiyon uygulamalarına karşın, çalışan personelin elle teması, çalışılan ortamdaki havanın kalitesi ve zamana bağlı olarak kontamine olabilmektedir (Marouani-Gadri vd. 2010).

2.9 Süt İşleme Birimlerinde Termofilik Biyofilmlerin Kontrolü

Gıda endüstrisinde mikrobiyal biyofilmlerle mücadele çeşitli stratejiler tercih edilebilmektedir. Bu stratejiler:

- 1) Gıdaların temas ettiği yüzeylerin mekanik olarak temizlenmesi (firçalama),
- 2) Çeşitli antimikrobiyal ajanların uygulanması,
- 3) Yüzeyler üzerinde hiçbir surette nem ve besinsel artık bırakmadan mikroorganizmaların biyofilm geliştirmelerini engellemek,
- 4) Gıdaların işlendiği yüzeylerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek gıdanın işlendiği çevrede ya da gıdada bulunabilecek mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını fiziksel ve kimyasal modifikasyonlarla engellemek,
- 5) Uygun sanitasyon işlemlerinin uygulanması gibi yaklaşımları kapsamaktadır (Stewart vd. 2000).

Gıda hijyeninin devamlılığı için gıdanın işlendiği çevredeki mikrobiyal biyo-filmlerin mutlak surette giderilmesi gerekmektedir. Gıdanın temas ettiği yüzeyde az miktarda besinsel artık kalması dahi, birçok mikroorganizmanın bu yüzeylere tutunarak biyofilm üretebilmesine imkan sağlamaktadır. Şayet besinsel bulaşının olduğu yüzeylerde gelişen biyo-filmler giderilmezse daha sonra bu yüzeylerle temas eden gıdaların sürekli olarak kontamine olması söz konusudur. Bu nedenle, fabrika planı ve cihazlarının hijyenik amaçlara uygun dizaynı, materyallerin seçimleri, doğru kullanılması, fiziksel metodların yanısıra kimyasal giderimde doğru deterjanların ve dezenfektanların seçimi gibi çeşitli önlemler ve kontrol stratejileri ile gıda temaslı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunun kontrolü rutin bir şekilde yapılmalıdır. Gıda endüstrisinde biyo-filmler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yaklaşımların esas alındığı çeşitli stratejiler ile kontrol altına alınabilmektedir. Özellikle son yıllarda tüketici sağlığı gözetilerek yeni biyolojik kontrol stratejileri yaygınlık kazanmaktadır. Örneğin; antimikrobiyal peptitler olan bakteriyosinler ve enzimler de biyo-filmlerin elimine edilmesi için gıdaların işlendiği çevrelerde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Kumar ve Anand 1998). Ayrıca proteaz ve karbohidraz gibi enzimlerin de biyolojik olarak aktif karışımlarını içeren özel temizleyiciler de kullanılmaktadır (Johansen vd. 1997). Buna ilaveten, gıda paketleme materyallerine eklenmiş antimikrobiyal kimyasallar mikrobiyal bulaşmayı engellemek üzere kullanılabilir (Halek ve Garg 1988). Görece uzun vadede maliyeti düşürmesi açısından mikroorganizmaların adezyonunu en başından engellemek için modifiye yüzeylerin kullanılması gibi yeni yaklaşımlar da değerlendirilmektedir. Örneğin; yüzeylerin hidrofobitesinin ya da yüzey pürüzlülüğünün azaltılması gibi

modifikasyonlar bakteriyel tutunmayı asgari düzeye indirebilmektedir (Boulane-Petermann 1996).

Termofilik biyofilmlerin süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde kontrolüne ilişkin alınan öncelikli tedbir ürünlerin işleme süresinin kısaltılmasıdır. Bu tedbirden farklı olarak çeşitli sanitasyon ajanlarının kullanılması ve sanitasyon sıklığının arttırılması, sıcaklıkların manüple edilmesi, gıdalar ile temas yüzeyinin azaltılması gibi tedbirler de alınmaktadır. Ürün işleme süresinin santrifüj seperatörlerinde ve pastörizasyon aşamasında kullanılan ısı değiştirme plakalarında 6 ila 8 saat arasına çekilerek azaltılması termofilik basil gelişimini önemli ölçüde azaltabilmektedir. Süt tozu işleme ünitelerinde termofil gelişimini mümkün mertebe azaltmak için süreç 18 ila 24 saat arasında sınırlandırılır. Her bir üretim döngüsünde, ünitelerdeki ıslak yüzeyler, yerinde temizlik rejimleriyle (CIP) temizlenir. Bu rejimler çoğunlukla sıcak suyla yıkama, % 1.5'lik kaustik bir ajanla 75 °C'de 30 dakikalık bir yıkama işlemini, % 0.5'lik nitrik asitle 75 °C'de 20 dakikalık bir yıkama işlemini ve kimyasal temizliği takiben son bir sıcak suyla yıkama ve durulama aşamalarını kapsar (Bylund 1995). Kaustik yıkama organik materyallerin giderimine imkan tanırken, nitrik asitle yıkama inorganik materyallerin uzaklaştırmasını sağlar. Süt işleme ünitelerinde kullanılan bir sanitasyon ajanı ekipman yüzeylerinde kalan mikrobiyal popülasyonu inaktive etmek üzere kullanılır. Ancak söz konusu yüzeylerde biyofilm yapılarının varlığı mevcutsa, tercih ve tavsiye edilen sanitasyon ajanlarının ve yerinde temizlik rejimlerinin etkinlikleri tartışmaya açık bir konumdadır (Watkinson 2008). Kullanılacak sanitasyon ajanı biyofilm yapılarını da yok edebilecek nitelikte olmalıdır. Yerinde temizlik rejimlerini termofilik basillerin biyofilmlerinin giderimindeki etkinliği oldukça değişkendir. Örneğin; süt endüstrisinde yerinde temizlik işlemlerinde tekrar tekrar kullanılan sodalı kaustik yıkama solüsyonlarından bazı *Bacillus* spp. suşları izole edilebilmiştir (Lindsay vd. 2000). Ancak benzer temizlik işlemlerinin ve bu işlemlerde kullanılan ajanların (kombine bir şekilde kaustik solüsyon ve nitrik asit uygulaması) birçok termofilik biyofilmlerin giderimine imkan tanımıştır (Parkar vd. 2004). Ancak sanitasyon rejimlerinde kullanılan ajanların tavsiye edilen konsantrasyon değerlerinin altına inilmesi ya da uygulama sıcaklıklarının azaltılması, söz konusu ajanların biyofilmleri giderme potansiyellerini ciddi ölçüde azaltmaktadır. Kaustik ve asidik ajanların

kombine bir şekilde uygulanmaları sporisidal etkinlik de göstermektedir (Knight ve Weeks 2008, Seale 2009). Süt endüstrisindeki termofilik basillerin gideriminde sıklıkla tercih edilen stratejiler Çizelge 2.4’te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4 Süt endüstrisindeki termofilik basillerin giderimi için kullanılan yaklaşımlar stratejiler (Gopal vd. 2015)

Strateji	Uygulama
Fiziksel	Mekanik temizlik (firçalama), Ultrasonikasyon
Kimyasal	Sümfaktanlar, organik madde bileşikleri, emülsiyon yapan ajanlar, Enzim ilavesi Asidik (HNO ₃) ve alkale (NaOH.) deterjanların kombinasyonları Oksitleyici ajanlar (hidrojen peroksit), kloro dayalı ajanlar (sodyum hipoklorit), yüzey aktif bileşikler (kuaterner amonyum bileşikler vb.), iyodoforlar Moleküler ozon veya onun ayrışmış türevleri (hidroksil radikaller vb.)
Biyolojik	Enzimler (proteaz ve polisakkariti parçalayan enzimler vb.) ve bakteriyosinler (nisin, laktisin 3147 veya pediosin PA1 vb.) Enfekte bakterilere litik veya lizogenik yol aracılığı ile (fajlar)

Süt endüstri çevrelerindeki termofilik biyofilmlerin kontrolü için kimyasal olmayan yollardan biri de ürün işlem sıcaklıklarını manüple etmektir. Örneğin; kremanın süttten ayrıştırıldığı santrifüj seperatörlerinde sıcaklığı 15 ila 30 °C arasına çekmek ürünün işlenme süresini geciktirse de son aşamada termofilik biyofilm oluşumunu ve termofil yükünü önemli ölçüde azaltmaktadır. Bir diğör örnekte pastörizasyon ünitelerindeki ısı değışim plakalarında sıcaklıkların düşürülmesi, *Streptococcus thermophilus* biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır (Knight vd. 2004). Yine başka bir laboratuvar çalışmasında inkübasyon sıcaklığının 55 °C’den 48 °C’ye düşürülmesi, *A. flavithermus* biyofilmleri içerisindeki sporulasyonu çok ciddi düzeyde azalttığı saptanmıştır. Söz konusu yaklaşımın süt endüstrisinde *in situ* (yerinde) uygulanması mevcut riski azaltabilecek potansiyeldedir. Ürünlerin temas ettiklerin yüzeylerinin alanlarının küçültülmesi de ilgili alandaki bir diğör kimyasal olmayan stratejidir. Termofililerin optimum koşullarda gelişebileceği sıcaklıklarda doğrudan buhar enkeksiyonu (DSI) gibi doğrudan temasa dayalı ısıtma sistemleri bu anlamda riski azaltacak şekilde sonuçlar

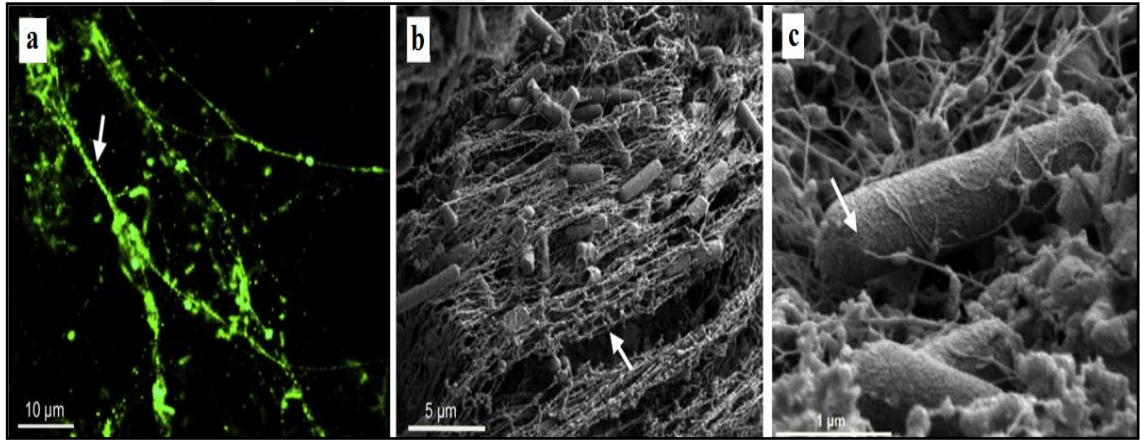
vermiştir. Doğrudan buhar enjeksiyonu, sütün içerisine buharı doğrudan enjekte ederek sütün çok hızlı bir şekilde ısıtılmasına olanak sağlar ve bu yönüyle termofilik basillerin gelişimini yavaşlatır ya da tamamen engeller (Refstrup 1998, 2000). Ancak söz konusu sistem plaka ısı değiştiricileri gibi dolaylı ısıtma sistemlerine nispeten oldukça pahalıdır. Ayrıca sütün içerisine doğrudan buhar enjekte edilmesi sütün sulanmasına neden olarak, fazla suyun uzaklaştırılması için flaş pastörizasyon uygulanmasını zorunlu kılarak maliyeti arttırmaktadır. Gelecekte süt endüstrisinde termofilik biyofilmlerin neden olabilecekleri riskleri asgari düzeye çekebilmek adına en başta ürün işleme süreçlerinin (sıcaklık, süre) modifiye edilmesine yönelik stratejilerin belirlenmesi bazı araştırma gruplarınca hedeflenmektedir. Bu yaklaşıma ilaveten termofilik basillerin tutunma eğilimini azaltacak mahiyette ve kalitede yeni paslanmaz çelik malzemelerin geliştirilmesi ve daha etkin sanitasyon prosedürlerinin geliştirilmesi yine ön planda olan stratejilerden bazılarıdır (Bremer vd. 2009).

Pastörizasyona (72 °C, 15 s) dayanan işleme süreçlerinde çiğ sütün içindeki ısıya duyarlı patojenik ve gıda bozulmalarına neden olan bakteriler elimine olmaktadır. İleri işleme süreçlerinde (starter'in ilavesiyle pH'ın düşürülmesi, kurutma, tuz ilavesi ve soğutma) ısı işleme dayanıklı termodurik bakterilerin gelişiminin engellenmesi hedeflenmektedir. Mikrobiyal gelişimi inhibe eden manipulasyonlar ötesinde, sütün işlendiği her süreçte öncelikle iyi hijyen kurallarına riayet edilmesi gerekmektedir. Sütün işlendiği süreçlere dışarıdan bir kontaminant dahil olmadığı halde bozulmalardan kaynaklı bir ürün kaybı yaşanıyorsa ilk etapta düşünülmesi gereken durum, süt işleme ekipman ve ünitelerinde sürekli kontaminasyona neden olabilecek biyofilmlerin varlığıdır (Bouman vd. 1982, Koutzayiotis 1992).

2.10 Biyofilm Çalışmalarında Uygulanan Mikroskopi Temelli Metodlar

Biyofilm çalışmalarında özellikle yüzeylerin analizinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) önemli bilgiler elde edilmesine imkan sağlamaktadır (Şekil 2.7) (Notermans vd. 1991, Zottola 1991). Bazı çalışmalarda ayrıca akridin oranj ile muamele edilmiş preparatlar epifloresan mikroskobu ile de analiz edilebilmektedir (Holah vd. 1989). Interferens kontrast mikroskobu, atomik güç mikroskobu (AFM) ve konfokal lazer

taramalı mikroskopu (CLSM) çalışmaları da biyofilm araştırmalarında kullanılan önemli mikroskopik tekniklerdir (Ladd ve Costerton 1990, Caldwell vd. 1992, Beech 1996, De beer vd. 1997). AFM’de ince bir sonda örneğe çok yaklaştırılır. Böylece sonda ile örnek arasında zayıf atomik güçler tesis edilir. Bu mikroskopun elektron mikroskopuna göre avantajı zahmetli preparasyon gerektirmemesidir. FISH (floresan *in situ* hibridizasyon) zenginleştirilmiş organizmaları izlemek veya tanımlamak için kovalent olarak floresans boya bağlı özgül bir nükleik asit probu kullanılarak yapılan bir yöntemdir. FISH teknolojisi mikrobiyal ekolojinde, gıda endüstrisinde ve klinik tanıda özgül patojenlerin tanımlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. FISH, ekolojide mikroskopik teşhiste ve organizmaları yaşam ortamlarında doğrudan izlemek amacıyla kullanılabilir. FISH aynı zamanda mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu direk olarak mikroskopta belirlemede kullanılan bir yöntemdir (Madigan ve Martinko 2010). Ayrıca biyofilm sayımı için yaygın olarak çevresel taramalı elektron mikroskopu (ESEM) kullanılmaktadır (Little vd. 1991, Hodgson vd. 1995).



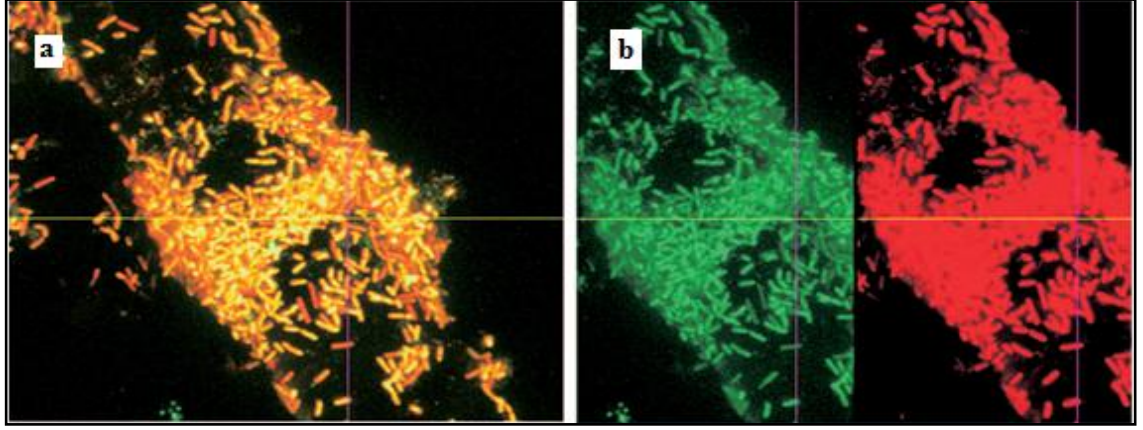
Şekil 2.7 B. subtilis biyofilmlerinin CLSM ve SEM görüntüsü (Bridier vd. 2013)

a. Tiyoflavin T ile etiketlendikten sonra elde edilen fibrilli CLSM görüntüsü
b, c. Farklı büyütmelerde biyofilm ve hücre morfolojisinin SEM görüntüsü

Konfokal mikroskopisinin ilk kullanımı 1955’te Marvin Minsky tarafından gerçekleştirilmiş olup, CLSM biyofilmdeki EPS bileşenlerine zarar vermeden onların yerinde incelenmesinde floresan boyalar kullanılan önemli bir mikroskopik yöntemdir. (Semwogerere ve Weeks 2005, Lawrence vd. 2007). Diğer ışık mikroskopu metodları nispeten, biyofilm çalışmaları için CLSM çok daha uygun tekniktir (Tolker-Nielsen vd.

2000, Neu vd. 2001, Donlan ve Costerton 2002, Dunne 2002, Mattila 2002). Canlı biyofilmlerin ilk CLSM analizleriyle, biyofilmi tesis eden mikrokoloniler arasında açık su kanallarının varlığını gösterilmiştir (Lawrence vd. 1991). CLSM biyofilm çalışmalarında sağladığı avantajlar: “Örneklerin dehidrasyon ve fiksasyon işlemlere gerek duyulmadan, onları doğal sulu durumunda incelenmesi, odaklanma biyofilmlerin derinliklerine doğru ince optik kesitler halinde kaydedilmesi” (Wimpenny ve Colasanti 1997). Biyofilm çalışmalarında CLSM ile FISH kombine edilirse, bir biyofilm örneğindeki kompleks mikrobiyal popülasyonu detaylı bir şekilde araştırmak mümkün olabilmektedir (Madigan ve Martinko 2010).

CLSM mikrobiyal ekolojide geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu teknikle mikrobiyal habitatta bulunan filogenetik olarak farklı hücre popülasyonlarını tanımlamak ya da bir biyofilmdeki farklı tabakaların bileşenlerini ayırt etmek mümkündür. CLSM’de mikrobiyal film gibi nispeten kalın bir örnekte, sadece biyofilmin yüzeyindeki hücreler değil, farklı tabakalardaki hücreler de lazer ışınının odak düzlemi ayarlanarak, gözlenebilmektedir. CLSM için hazırlanan preparatlar genellikle floresan boyalarla boyanır ve belirgin hale getirilir. CLSM, bilgisayar yazılımları ile donatılarak, daha sonra dijital görüntülerin işlenmesi sağlamaktadır. Böylece, farklı biyofilm tabakalarını oluşturan düzlemlere ait görüntüler dijital olarak üst üste getirilir ve tüm örneğin 3D görüntüsü elde edilir (Şekil 2.8) Dahası, CLSM tekniği mikrobiyal bileşimin derinliğine bağlı olarak nasıl değiştiğini gözlemlemek istediğimiz kalın örnekler için kullanılabilir (Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 2.8 Cam yünü iplikleri üzerinde 28 oC’de, 24 saatlik *B. cereus* biyofilmlerinin BacLight boyaları ile boyanarak elde edilen CLSM görüntüsü (Vilain vd. 2009)

a,b.Kırmızı görünen hücreler (Propidium iodide) a. Farklı kanallarda görüntülendiklerinde yeşil floresanslı merkezlere (Syto 9) sahiptirler b. Tek kanallı modda incelendiklerinde kırmızı renkte görüntülenen aynı hücreler, aynı zamanda yeşil kanalda yeşil renkte gözlenmektedir. Bu da (a ve b) onların yoğun kırmızı floresanla çevrili yeşil merkezlere sahip olduklarını gösterir

CLSM ile görüntüleme, tutunan bakterilerin doğrudan boyanması ile canlı/ölü hücre DNA’sının Adenin ve Timince zengin bölgelerine bağlanan, DAPI (4’ 6-diamidino-2-phenylindole) kullanılabilir. Bu teknik, biyomateryale tutunan bakteriler için CFU sayılarını karşılaştırmada toplam bakteriyel miktarın hesaplanması ve görüntülenmesi için uygundur. Ayrıca, proteinler ve moleküller için floresan boyalar mevcuttur. Örneğin, EPS matriksi konkanavalin A gibi özel glukan boyalar kullanılarak görüntülenebilir (Hannig vd. 2010). Dahası, polisakkaritlerin boyanması için, sadece β -1,3 ve β -1,4 glukanlara bağlanan, kalkoflor beyaz da kullanılır. Biyofilm matriksinde bulunan eDNA, Propidium iodide (PI), 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO), TOTO-1, TO-PRO 3, PicoGreen ve SytoX gibi hücre içine giremeyen DNA bağlayıcı floresan boyalar kullanılarak analiz edilebilir. Ayrıca eDNA, LIVE/DEAD BacLight™ kitinde bulunan Syto ile PI’un karışımı gibi hücre içine girebilen DNA bağlayıcı boylar ile boyanmaktadır. Bu iki boyanın eşzamanlı ilave edilmesi ile bir boyanın emisyon spektrumu diğer boyanın uyarım spektrumu ile kesişirse Förster rezonans enerji transferi (FRET) oluşabilir ve bu etki Syto 9/PI boyaları ile çalışmak için bir avantajdır (Schlafer ve Meyer 2016). PI düşük bir iyonik yüke sahip olduğundan, DNA için yüksek bir afiniteye sahiptir. Canlı hücreler için, küçük moleküllü Syto 9, canlı ve cansız hücreler için kullanılabilirken, buna karşın PI

boyası sadece ölü hücrelerin boyanmasında kullanılır. SytoX'in, yeşil, portakal veya mavi renkleri mevcut olup, nükleik asitleri boyar ve Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere kolaylıkla nüfuz eder (Hannig vd. 2010). Biyofilm matriksinin bileşeni olan proteinler ise, FilmTracerTMSyPro gibi spesifik olmayan boyalar ile görüntülenebilir. Ayrıca, titoflavin (ThT), CDy11 floresan boya gibi amiloid-spesifik boyalar kullanılabilir. Diğer bir matriks bileşeni olan lipitler, genellikle Nile kırmızısı ile boyanır. Ayrıca, BODIPY, FM boya ile de boyanabilmektedirler (Schlafer ve Meyer 2016).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri izolatları ve referans suşlar

Tez sürecinde ön çalışmalar kapsamında, A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda mevcut olan ve tür/cins tanımları yapılmış *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine dahil, 20 *Geobacillus* ve 84 *Anoxybacillus* izolat ve referans suşunun biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Ön çalışmalarda kullanılan izolatların ve referans suşların sayısı ve listesi, çizelge 3.1 - 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Çalışma dahilinde biyofilm üretim miktarları belirlenen *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatları ile referans suşlarının sayıları

Bacteria			
Firmicutes			
Bacilli			
Bacillales			
Bacillaceae			
Cinsler	Bakteri izolatları sayısı	Referans suş sayısı	Bakteri sayısı
<i>Anoxybacillus</i>	65	19	84
<i>Geobacillus</i>	10	10	20
Toplam	75	29	104

Çizelge 3.2 Ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri itibariyle taranan izolatlar ve referans suşlar

Kolleksiyon Kodu	Cins/Tür adı
GEOBACILLUS	
A353	<i>Geobacillus</i> sp.
C304	<i>Geobacillus</i> sp.
D413	<i>Geobacillus</i> sp.
E173b	<i>Geobacillus</i> sp.
DSM 7263 ^T	<i>G. kaustophilus</i>
A113	<i>G. stearothermophilus</i>
DSM 22 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>
ATCC 43223 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>
DSM 5934 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>
DSM 22625 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>
DSM 465 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>
DSM 22628 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>
DSM 22629 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>
DSM 2542 ^T	<i>G. thermoglucosidans</i>
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>
DSM 5366 ^T	<i>G. thermoleovorans</i>
E134	<i>G. toebii</i>
DSM 14590 ^T	<i>G. toebii</i>
DSM 13174 ^T	<i>G. vulcanii</i>

Çizelge 3.2 Ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri itibariyle taranan izolatlar ve referans suşlar (devam)

Koleksiyon Kodu	Cins/Tür adı
ANOXYBACILLUS	
A3210	<i>Anoxybacillus</i> sp.
A321	<i>Anoxybacillus</i> sp.
E184aa	<i>Anoxybacillus</i> sp.
E184ab	<i>Anoxybacillus</i> sp.
E208a	<i>Anoxybacillus</i> sp.
DSM 15939 ^T	<i>A. amylolyticus</i>
NCIB 13972 ^T	<i>A. ayderensis</i>
A142	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A146	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A335	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A392b	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A394	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A404	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A412b	<i>A. caldiproteolyticus</i>
A413	<i>A. caldiproteolyticus</i>
C226	<i>A. caldiproteolyticus</i>
D504	<i>A. caldiproteolyticus</i>
D621	<i>A. caldiproteolyticus</i>
D623	<i>A. caldiproteolyticus</i>
D494	<i>A. caldiproteolyticus</i>
DSM 15730 ^T	<i>A. caldiproteolyticus</i>
DSM 25520 ^T	<i>A. calidus</i>
A351a	<i>A. flavithermus</i>
A352b	<i>A. flavithermus</i>
A371	<i>A. flavithermus</i>
D486	<i>A. flavithermus</i>
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i>
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>flavithermus</i>
D401a	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>
D404	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>
D463	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>flavithermus</i>
NCIB 13933 ^T	<i>A. gonensis</i>
D433a	<i>A. kamchatkensis</i>
DSM 14988 ^T	<i>A. kamchatkensis</i>

Çizelge 3.2 Ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri itibariyle taranan izolatlar ve referans suşlar (devam)

Koleksiyon Kodu	Cins/Tür adı
ANOXYBACILLUS	
DSM 21706 ^T	<i>A. kaynarcensis</i>
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D222b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D376b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E183	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E184b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E206b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E208b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E272	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E331	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D371a	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D394	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D455	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
D594	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E123	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E237	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
E243	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
NCIB 13971 ^T	<i>A. kestanbolensis</i>
DSM 19169 ^T	<i>A. mongoliensis</i>
DSM 17127 ^T	<i>A. rupiensis</i>
DSM 22626 ^T	<i>A. salavatliensis</i>
A414	<i>A. salavatliensis</i>
D232a	<i>A. salavatliensis</i>
D242b	<i>A. salavatliensis</i>
A402b	<i>A. salavatliensis</i>
C245	<i>A. salavatliensis</i>
D36	<i>A. salavatliensis</i>
D392	<i>A. salavatliensis</i>
C163a	<i>A. salavatliensis</i>
D98a	<i>A. salavatliensis</i>
D202a	<i>A. salavatliensis</i>
D203b	<i>A. salavatliensis</i>
D204	<i>A. salavatliensis</i>
D205	<i>A. salavatliensis</i>
D211	<i>A. salavatliensis</i>
D213	<i>A. salavatliensis</i>
D214	<i>A. salavatliensis</i>
D221a	<i>A. salavatliensis</i>
D243	<i>A. salavatliensis</i>
D487	<i>A. salavatliensis</i>
D503	<i>A. salavatliensis</i>
E206a	<i>A. salavatliensis</i>

Çizelge 3.2 Ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri itibariyle taranan izolatlar ve referans suşlar (devam)

Koleksiyon Kodu	Cins/Tür adı
ANOXYBACILLUS	
D591	<i>A. salavatliensis</i>
DSM 27374 ^T	<i>A. suryakundensis</i>
DSM 16325 ^T	<i>A. tepidamans</i>
DSM 17141 ^T	<i>A. thermanum</i>
DSM 17075 ^T	<i>A. voinovskiensis</i>

Tez çalışmalarının başlangıcında 20 *Geobacillus* ve 84 *Anoxybacillus* referans suşun ve izolatın, biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Bu amaçla;

i) Polistiren mikrotitrasyon plaklarında, iki farklı TSB içeriği (NaCl ihtiva eden ve etmeyen TSB) iki farklı inkübasyon sıcaklığı (55 °C ve 65 °C) ve iki farklı inkübasyon süresi (48 ve 96 saat) gibi 8 farklı parametrede tüm bakterilerin biyofilm üretim potansiyelleri taranmıştır.

ii) İlk aşamayı takiben, tüm bakteriler yine biyofilm üretim kapasitelerinin saptanması adına standart tam yağlı süt içerisinde geliştirilmiştir. Söz konusu içeriğin tercih edilmesi, tez dahilinde ileride çalışmalarda bu bakterilerin süt ortamında nasıl bir biyofilm davranışı sergileyeceklerini saptamak amacıyla yapılmıştır.

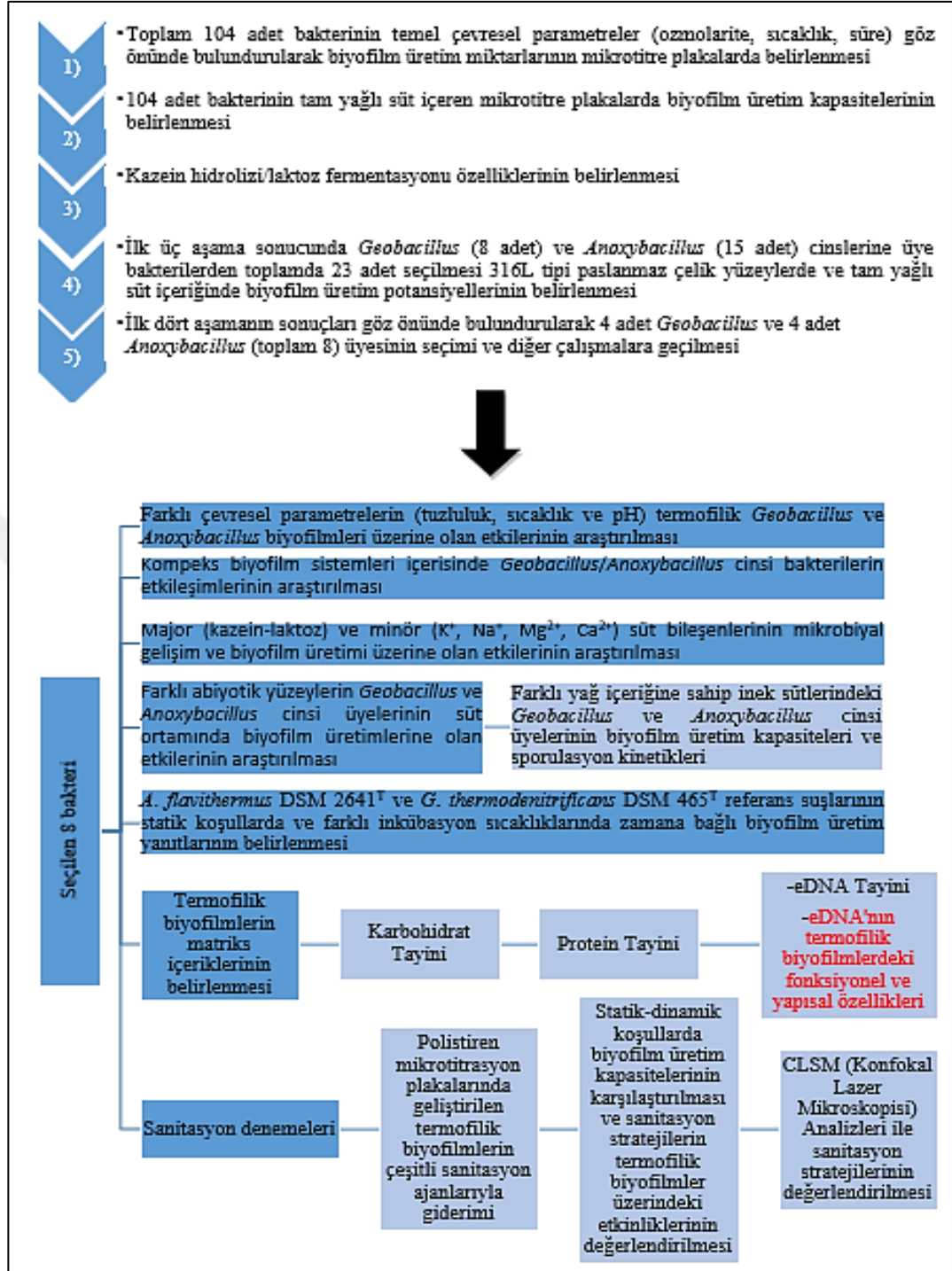
iii) Ayrıca süt içeriğinin modifiye edileceği ve bu modifikasyonların biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin değerlendirileceği daha sonraki çalışmalara yön vermesi adına; tez dahilindeki bakterilerin “laktozu fermente edebilme” ve “kazeini hidrolize edebilme” nitelikleri de saptanmıştır.

iv) Çalışılan 104 bakteri içerisinde polistiren mikrotitre plakalarda TSB ve standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim kapasiteleri göz önünde bulundurularak seçilen 23 bakterinin gıda çevrelerinde sıklıkla kullanılan bir yüzey materyali olan

paslanmaz çelik yüzeyleri içeren standart tam yağlı süt içerikli ortamlardaki biyofilm üretim karakteristikleri belirlenmiştir.

v) Nihai olarak bakterilerin gerek TSB/Standart Tam Yağlı Süt içeren polistiren plakalardaki biyofilm üretim potansiyelleri, gerekse ara seçimle belirlenen 23 bakterinin standart tam yağlı süt içeren ortamlardaki paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm üretim potansiyelleri ve laktoz fermentasyonu/kazein hidrolizi gibi fenotipik özellikleri baz alınarak daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere toplam 8 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsine dahil referans suş ve izolatin seçimi yapılmıştır.

Gerek 8 bakterinin seçim süreci gerekse seçim sürecinden sonraki çalışmaların akış şeması şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması

3.1.2 Besiyerleri

Çizelge 3.3 Medium I Agar besiyeri içeriği (Suzuki vd. 1976a, b)

Medium I Agar	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Nişasta	10 g	Sigma S2004
Kazein pepton	5 g	Merck 1.07213
Yeast ekstrakt	3 g	Merck 1.03753
Meat ekstrakt	3 g	Merck 1.03979
Potasyum fosfat dibazik	3 g	Sigma P8281
Potasyum dihidrojen fosfat	1 g	Scharlau PO0260
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su pH: 7,0 ± 0,2	1000 mL	
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.4 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği

Triptik Soy Agar	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
(D+) Glukoz	2,5 g	Merck 1.08342
Potasyum fosfat dibazik	2,5 g	Sigma P8281
Sodyum klorür	5 g	Merck 1.06404
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su pH: 7,3 ± 0,2	1000 mL	
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.5 Standart tam yağlı süt içeriği

Standart tam yağlı süt	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Skim Milk	100 g	Sigma 7166
Distile su pH: 7,0 ± 0,2	900 mL	
İçerik 118 °C'de 5 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.6 Bazal Medium içeriği (Claus ve Berkeley 1986)

Bazal Medium	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Diamonyum hidrojen fosfat	1 g	Merck 1.01207.0500
Potasyum klorür	0,2 g	Sigma P9541
Magnezyum sülfat	0,2 g	Sigma 230391
Yeast extract	0,2 g	Merck 1.03753
Distile su	1000 mL	
pH: 7,0 ± 0,2		
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.7 Laktoz katkılı Bazal Medium içeriği (Claus ve Berkeley 1986)

Laktoz katkılı Bazal Medium	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Diamonyum hidrojen fosfat	1 g	Merck 1.01207.0500
Potasyum klorür	0,2 g	Sigma P9541
Magnezyum sülfat	0,2 g	Sigma 230391
Yeast extract	0,2 g	Merck 1.03753
Laktoz	5 g	Merck 1076601000
15 mL % 0,04'lük fenol red çözeltisi	15 mL	Merck 968241
Distile su	985 mL	
pH: 7,0 ± 0,2		
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.8 Skim Milk Agar içeriği

Skim Milk Agar	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Skim Milk	100 g	Sigma 7166
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	900 mL	
pH: 7,0 ± 0,2		
Skim milk içeriği 118 °C'de 5 dakika süresince otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Agar katkısı 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilen içerikler otoklavlamadan hemen sonra karıştırılmıştır.		

3.1.3 Çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Çizelge 3.9 1 N NaOH çözeltisi içeriği

1 N NaOH çözeltisi	g/L	Kimyasal marka ve kodları
NaOH	40 g	Merck 106469
Distile su	1000 mL	

Çizelge 3.10 1 N HCl çözeltisi içeriği

1 N HCl çözeltisi	mL (v/v)	Kimyasal marka ve kodları
HCl (% 37'lik)	82,6 mL	Merck 1003172500
Distile su	917,4 mL	

Çizelge 3.11 Serum fizyolojik içeriği

Serum Fizyolojik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Sodyum klorür	8,5 g	Merck 1.06404
Distile su	1000 mL	

Çizelge 3.12 Kristal viyole çözeltisi içeriği

Kristal viyole çözeltisi	% 0.1 (w/v)	Kimyasal marka ve kodları
Kristal viyole	0,1 g	Merck C0775
Distile su	100 mL	

Çizelge 3.13 Metanol çözeltisi içeriği

Metanol çözeltisi	% 95 (v/v)	Kimyasal marka ve kodları
Metanol	95 mL	Merck 1.01408
Distile su	5 mL	

Çizelge 3.14 Etanol/Aseton çözeltisi içeriği

Etanol/Aseton çözeltisi	70:30 (v/v)	Kimyasal marka ve kodları
Saf etanol	70 mL	Scharlau ET0013
Aseton	30 mL	Merck 1.00013

Çizelge 3.15 % 10'luk SDS çözeltisi içeriği

% 10'luk SDS çözeltisi içeriği	% 10 (w/v)	Kimyasal marka ve kodları
SDS	10 g	Sigma L4390
Distile su	100 mL	

Çizelge 3.16 1 mg/mL'lik glukoz çözeltisi içeriği

1 mg/mL'lik glukoz çözeltisi	mg/mL (10 mL)	Kimyasal marka ve kodları
Glukoz	0,01 g	Merck 1.08342
Distile su	10 mL	

Çizelge 3.17 % 5'lik fenol çözeltisi içeriği

% 5'lik fenol çözeltisi	% 5 (w/v)	Kimyasal marka ve kodları
Fenol	5 g	Merck 1002060250
Distile su	95 mL	

Çizelge 3.18 BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisi içeriği

2,5 mg/mL'lik BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisi	mg/mL (10 mL)	Kimyasal marka ve kodları
BSA	0,025 g	Sigma A-2153
Distile su	10 mL	

Çizelge 3.19 Protein tayininde kullanılan A ve B reaktifi içerik ve miktarları

A ve B reaktifleri	% (w/v)	Kimyasal marka ve kodları
A reaktifi		
Na ₂ CO ₃	% 2	Sigma S7795
NaOH (0,1 N)	% 0,4	Merck 1.06482
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ . 2H ₂ O	% 0,16	Merck 1.06663
B reaktifi		
CuSO ₄ .5H ₂ O	% 4	Sigma C8027

Çizelge 3.20 Kloroform/izoamil alkol çözeltisi içeriği

Kloroform/izoamil alkol çözeltisi	100 mL (24:1) (v/v)	Kimyasal marka ve kodu
Kloroform	96 mL	Merck 107024
İzoamil alkol	4 mL	Merck 100979

Çizelge 3.21 Fenol/kloroform/izoamil alkol çözeltisi içeriği

Fenol/kloroform/izoamil alkol çözeltisi	100 mL (25:24:1) (v/v)	Kimyasal marka ve kodu
Fenol	50 mL	Merck 1002060250
Kloroform	48 mL	Merck 107024
İzoamil alkol	2 mL	Merck 100979

Çizelge 3.22 % 70'lik etanol çözeltisi içeriği

% 70'lik etanol çözeltisi içeriği	100 mL (v/v)	Kimyasal marka ve kodu
Etanol	70 mL	Merck 100983
Distile su	30 mL	

Çizelge 3.23 Tris-EDTA tamponu içeriği

Tris-EDTA (TE) Tamponu	50 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodları
Tris EDTA Distile su pH: 7,0 ± 0,2	0,3 g 4,6 g 50 mL	Sigma T6066 Sigma E-5134
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.24 10 mM Tris-HCl tamponu içeriği

10 mM Tris-HCl tamponu	100 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
Trizma base Distile su pH: 8.0 ± 0.2	0.12 g 100 mL	Sigma T6066
İçerik hazırlandıktan sonra 0.22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.25 50 mM Tris-HCl tamponu içeriği

50 mM Tris-HCl tamponu	100 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
Trizma base Distile su pH: 8,0 ± 0,2	0,61 g 100 mL	Sigma T6066
İçerik hazırlandıktan sonra 0.22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.26 0,02 N HCl tamponu içeriği

0.02 N HCl tamponu	100 mL (v/v)	Kimyasal marka ve kodu
HCl Distile su pH: 4,0 ± 0,2	0.167 mL 100 mL	Merck 1.00314
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.27 50 mM Sodyum asetat tamponu içeriği

50 mM Sodyum asetat tamponu	50 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
Sodyum asetat (3 sulu) Distile su pH: 5,0 ± 0,2	0,34 g 50 mL	Sigma 25022
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.28 Sodyum fosfat- NaCl tamponu içeriği

Sodyum fosfat- NaCl tamponu	10 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
20 mM Sodyum fosfat dibazik 6,7 mM NaCl Distile su pH: 6,9 ± 0,2	0,0284 g 0,0039 g 10 mL	Sigma S7907 Merck 1.06404
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.29 Borat - CaCl₂ tamponu içeriği

Borat - CaCl₂ tamponu	10 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
0,1 M Borik asit 0,1 M CaCl ₂ (3 sulu) Distile su pH: 8,0 ± 0,2	0,062 g 0,147 g 10 mL	Sigma B6768 Scharlau CA0193
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

Çizelge 3.30 50mM Glisin-NaOH tamponu içeriği

50mM Glisin-NaOH tamponu	100 mL (w/v)	Kimyasal marka ve kodu
Glisin Distile su pH: 9,0 ± 0,2	0,375 g 100 mL	Sigma G-8898
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µM por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir.		

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin biyofilm çalışmalarında kullanılmadan önceki ön aktifleştirme işlemleri

-86 °C’de gliserol stoklarındaki 20 *Geobacillus* ve 84 *Anoxybacillus* izolat ve referans suş, öncelikle MI (Medium I) besiyerine, bakterilerin gelişebileceği optimum sıcaklık gereksinimlerine göre (55 °C) 18 saat süresince geliştirilmiştir (Suzuki vd. 1976). Bu aşamadan sonra kültürler, NaCl içeren TSA (Triptik Soy Agar) besiyerinde 18-24 saat daha geliştirilmiştir. Bu kültürden 3 mL’lik NaCl katkılı TSB (Triptik Soy Broth) sıvı besiyerine yoğun bir bulanıklık olacak şekilde inoküle edilen kültürler, 18 saat çalkalamalı koşullarda (170 rpm) geliştirilmiştir. 5 mL’lik aktif sıvı kültürlerden 200 µL alınarak (% 4 inokülüm oranı), 3 mL’lik NaCl içermeyen TSB sıvı besiyerine aşılınmış ve son olarak kültürler çalkalamalı koşullarda (170 rpm) 6 saat geliştirildikten sonra biyofilm çalışmaları için hazır hale getirilmiştir. Bakterilerin inokülasyonu için önerilen süreç, laboratuvarımızda daha önce yürütülen proje ve tez çalışmaları dahilinde belirlenen koşullar göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Kilic vd. 2017). Bu üç basamaklı inokülasyon işlemi, çalışılacak bakterilerin özellikle biyofilm çalışmalarından önce sporulasyon fazına geçmelerini engelleyerek vejetatif hücre şeklindeki aktif yaşam formunda kalmalarını sağlamak amacıyla, tüm biyofilm üretim çalışmalarından önce gerçekleştirilmiştir. İlgili hazırlığın, sporulasyonu asgari düzeye çektiği faz-kontrast mikroskopisiyle de kanıtlanmıştır. Yine daha önceki çalışmalarımızda da saptadığımız üzere, ilgili inokülasyon süreci çalışılan kültürlerin “logaritmik fazda” maksimum hücre yoğunluğuna ulaşabilmeleri için gerekli görülmektedir. Bu sebeple, mevcut kültür koleksiyonumuzdaki termofilik basillerin biyofilm üretim potansiyellerinin istikrarlı ve doğru bir şekilde belirlenebilmesi için, kültürlerin logaritmik fazda ve ideal yoğunlukta olmaları sağlanmıştır.

3.2.2 Biyofilm üretim miktarlarının polistiren mikrotitre plakalarda tayini

İnokülüm hazırlığı yukarıda açıklandığı şekliyle gerçekleştirildikten sonra, 190 µL NaCl’siz ve standart TSB (% 0.5 NaCl) besiyerlerini içeren 96 kuyuluk mikrotitrasyon

plaklarına her bir kültürün inokülünden 10 µL aktarılmıştır. Mikrotitrasyon plakları termofilik basillerin optimum gelişebildiği 55-65 °C gibi iki kritik sıcaklıkta 48-96 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 2 defa steril serum fizyolojik ile yıkanmış ve planktonik fazdaki bakteriler uzaklaştırılmıştır. Kuyular 200 µL % 95'lik metanol ile 15 dakika fikse edilmiştir. Plakalar oda sıcaklığında kurutulmuş, % 0,1'lik kristal viyole çözeltisinden kuyulara 200 µL eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Tutunmayan boyanın uzaklaştırılması için plakalar distile suyla yıkanmıştır. Son olarak kuyulara 200 µL etanol:aseton (70:30 w/w) ilave edilmiştir. Plakalar 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole boyasının oluşturduğu optik yoğunluk, 595_{nm}'de Eliza okuyucusunda ölçülmüştür. Biyofilm ölçümünün sonucu her altı paralelde belirlenen absorbans değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca besiyeri içeren) kuyularının ortalamalarının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Mikrotitrasyon plaklarındaki biyofilm üretim miktarları, sınır değerleri (cut off) esas alınarak; üretici değil, zayıf, orta ve kuvvetli şeklinde kategorize edilmiştir (Çizelge 3.31). Çalışma iki tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Ayrıca şekil 3.2'de kristal viyole boyasının plaka kuyularındaki biyofilm örneklerine bağlanması gösterilmiştir. Kristal viyole boyası, kuyu çeperlerinde oluşan biyofilmlerin matriksine nüfuz ederek bu örneklerin boyanmasına olanak sağlamaktadır. Bu yöntem matriks miktarının belirlenmesine yönelik bir yöntem olduğu için indirekt bir yöntemdir (Stepanović vd. 2000, Vestby vd. 2009).

Çizelge 3.31 Negatif test kuyularından elde edilen optik yoğunluk (OD) değerlerine göre sınır değerlerin (cut off) hesaplanması

Sınır değeri (cut off)	Biyofilm üretim karakteristiği
$OD \leq OD_{cut\ off}$	Üretici değil
$OD_{cut\ off} < OD \leq 2 \times OD_{cut\ off}$	Zayıf Üretici
$2 \times OD_{cut\ off} < OD \leq 4 \times OD_{cut\ off}$	Orta düzey üretici
$4 \times OD_{cut\ off} < OD$	Güçlü üretici



Şekil 3.2.a. Çeperlerdeki biyofilm matrikslerine tutunmuş kristal viyole boyası,
b. Tutunmuş boyanın organik çözücülerle muamele edilmiş hali

3.2.3 Standart tam yağlı süt içeriğinde biyofilm üretim miktarlarının polistiren mikrotitre plakalarda tayini

Belirtilen çalışmada yine bir önceki çalışmada biyofilm üretimleri itibariyle taranan izolat ve referans suşların tamamı kullanılmıştır. İnokülüm hazırlığı daha önce belirtildiği şekliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.1). Bu aşamada, bir önceki 3.2.2 başlığı altında anlatılan yöntem “standart tam yağlı süt” içeriğine göre modifiye edilmiştir. İlgili çalışmada kullanılan besiyeri üretici firmanın (Sigma-Aldrich, Almanya) tavsiyesine göre hazırlanmış olup “standart tam yağlı süt” içeriğine karşılık gelmektedir. Bu çalışmada, yine iki kritik inkübasyon sıcaklığı (55 °C ve 65 °C) tercih edilmiş olup tek bir inkübasyon süresi çalışılmıştır (48 saat). Zira uzun inkübasyon koşullarında kullanılan standart tam yağlı süt içeriğindeki yüksek orandaki “whey” proteinleri, yüksek sıcaklıklarda denatüre olmakta ve sütün temas ettiği yüzeylere yoğun bir şekilde akümüle olmaktadır (Flint vd. 2001b). Standart tam yağlı süt ile modifiye edilen polistiren yüzey ve kristal viyole bağlanma esaslı biyofilm üretim miktarlarını belirlemeye yönelik bu yöntem literatüre göre ilk kez uygulanmış olup, bu yöntemin doğrudan süt ya da süt katkılı besiyeri içeriklerinin termofilik basillerin biyofilm üretim karakteristiklerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesinde tercih edilebileceği kanıtlanmıştır. Ancak inkübasyon süresinin özellikle yüksek sıcaklıklarda kısa tutulması, negatif kontrol kuyularında (yalnızca standart tam yağlı süt içeren kuyular) ve test kuyularında (inokülüm + standart tam yağlı süt içeren kuyular) standart tam yağlı süt içeriğindeki whey proteinlerinin denatüre olup polistiren yüzeylerde

yoğun bir şekilde akümüle olmasına bağlı olarak yanıtıcı ve istikrarsız sonuçlardan kaçınılması açısından son derece kritiktir. Bu çalışma, bir önceki çalışmada belirtilen (Yöntem 3.2.2) kristal viyole boyamasındaki tüm basamaklar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğin biyofilm üretim miktarının belirlenmesi için 6 paralel olacak şekilde plaka kuyularına uygulama yapılmıştır. Çalışma iki tekrar şeklinde yürütülmüştür.

3.2.4 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine dahil üyelerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme yeteneklerinin belirlenmesi

Laktoz fermentasyon testinde % 0,5 laktoz katkılı Bazal besiyeri kullanılmıştır (Claus ve Berkeley 1986). Aktif bakteri kültürlerinden 0,5'er mL alınarak 5 mL laktoz katkılı Bazal Medium ve Durham tüpü içeren test tüplerine inoküle edilmiştir. Tüpler 48 saat süresince çalkalamalı koşullarda (170 rpm) 55 °C'de inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler renk dönüşümüne ve gaz oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Rengin kırmızıdan sarıya döndüğü tüpler pozitif olarak (laktozu fermente edebilen) değerlendirilmiştir. Her bir bakteri için iki paralel test tüpü hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak inokülsüz test tüpleri kullanılmıştır.

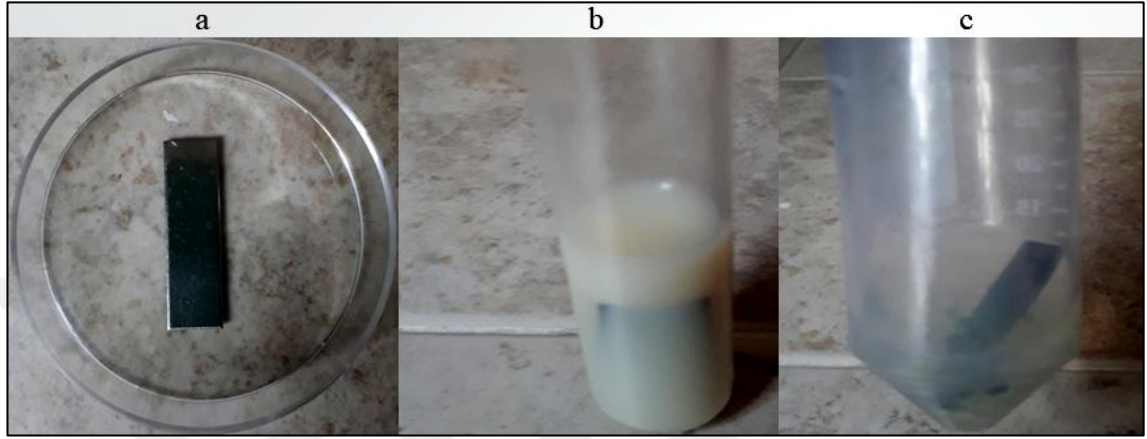
İlgili fenotipik karakteristiğin saptanması için % 3 agar katkılı standart tam yağlı süt (10 g "skim milk" + 90 mL distile su) tercih edilmiştir. Bakterilerin inokülüm hazırlıkları tamamlandıktan sonra kültürlerden steril yuvarlak öze ucuyla örnekler alınıp agar besiyerlerine çizgi ekim tekniğiyle ekim yapılmıştır. Pozitif sonuçlar besiyerlerinde kazeinin hidrolize edilmesi sonucunda oluşan şeffaf zonların varlığına göre değerlendirilmiştir. Petriler 55 °C'de 48 saat süresince inkübasyona kaldırılmıştır. Her bir bakteri için iki paralel petri inoküle edilmiştir.

3.2.5 TSB/Standart tam yağlı süt içeriklerinde biyofilm üretim kapasitelerine ve fenotipik karakteristiklerine göre seçilen bakterilerin paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi

Farklı inkübasyon koşullarında iki farklı TSB içeriğine (standart TSB, NaCl'siz TSB), standart tam yağlı süt içeriğine ve fenotipik karakteristiklerine (laktoz fermentasyonu/kazein hidrolizi) göre güçlü birer biyofilm üreticisi olduğu saptanan 23 adet [*Geobacillus* (8) ve *Anoxybacillus* (15)] bakterinin paslanmaz çelik yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiştir.

Yöntem dahilinde süt üretim çevrelerinde sıklıkla tercih edilmesinden ötürü 316 L tip paslanmaz çelik yüzeyler (0,8 cm, 2,5, 0,1 cm) kullanılarak termofilik izolatlar ve referansların biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiştir. İlgili çalışmada, Giaouris vd. (2005) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Besiyeri olarak standart tam yağlı süt kullanılmış ve tüplere (3,5 mL) dağıtılmıştır. Paslanmaz çelik kuponlar, biyofilm çalışmalarından önce üzerindeki olası organik kalıntıların temizlenmesi için öncelikle % 10'luk SDS ile 1 saat süresince karıştırılarak temizlenmiş ve sonra distile su ile bolca durulanmıştır. Steril çelik kuponlar, tüplere transfer edilmiş ve besiyeri ile beraber 118 °C'de 5 dakika sterilize edilmiştir. Hücre sayısını belirlemek amacıyla, kuponlar üzerindeki biyofilmleri parçalamakta kullanılacak cam boncuklar (r: 3 mm), 4,5 mL serum fizyolojik (SF) içeren tüplere yerleştirilmeden önce ve tüplere konduktan sonra toplamda 2 kez 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. İnokülasyon daha önce belirtildiği şekliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.1). Hazırlanan kültür süspansiyonlarından 1'er mL alınarak paslanmaz çelik yüzey içeren tüplere inoküle edilmiştir. Tüpler 55 °C ve 65 °C'de statik koşullarda 48 saat süresince inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda kuponlar aseptik koşullarda tüplerden çıkarılmış ve iki kez 10 mL'lik SF bulunduran tüplere planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla daldırılmıştır. Yıkanan kuponlar steril boş petrilere aktarılmış ve 5 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuponlar cam boncuk içeren tüplere aktarılmış ve 2 dakika süresince en yüksek devirde vortekslenmiştir. Sayım için bir seri dilüsyon yapılmış ve her bir dilüsyondan 10'ar µL alınarak MI agar bulunduran petrilere damla plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 18 saat boyunca 55 °C'de sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Sayım işlemleri log₁₀ tabanına çevrilerek cm² başına düşen koloni oluşturan birim (kob/cm²)

dikkate alınarak hesaplanmıştır. Çalışma 2 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tercih edilen 316 L tipi paslanmaz çelik kupon, kuponun daldırıldığı ortam ve yüzeyler üzerinde gelişen biyofilmlerin mekanik olarak dağıtılması için kullanılan cam boncuklar şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3.a. 316L tipi paslanmaz çelik kupon (0.8 x 2.5 x 0.1 cm), b. Tam yağlı süt içeren ortama daldırılmış kupon, c. Mekanik olarak (cam boncuklar) parçalanmış biyofilm örneği

3.2.6 Farklı çevresel parametrelerin (tuzluluk, sıcaklık ve pH) termofilik *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmleri üzerine olan etkilerinin araştırılması

İlgili çalışma, bu aşamadan önceki aşamalarda elde edilen bulgulara göre seçimleri yapılan toplam 8 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine üye bakteriler ile yürütülmüştür. İnokülüm hazırlığı (Yöntem 3.2.1) yukarıda açıklandığı şekliyle gerçekleştirildikten sonra, ilk aşama tuzluluğun biyofilm üretimi üzerindeki etkilerinin saptanması üzerine tasarlanmıştır. 190 µL farklı konsantrasyonlarda NaCl (% 0,0-0,5,-1,0, 1,5-2,0,-2,5-3,0-3,5, 4,0-4,5-5,0) ile hazırlanmış TSB içeren besiyerleri eklenen 96 kuyuluk mikrotitrasyon plaklarına her bir kültürün inokülümünden 10'ar µL aktarılmıştır. Mikrotitrasyon plakları, termofilik basillerin optimum geliştiği 55-65 °C gibi iki kritik sıcaklıkta, biyofilm üretimi için ideal olduğu kanıtlanmış ve daha önceki çalışmalarımızda saptanmış 96 saatlik süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde plakalar mikrobiyal gelişimi saptamak adına OD_{595nm}'de ölçüm yapıldıktan sonra boşaltılmış, kuyular 2 defa steril PBS (fosfat tamponu) ile

yıkanmış ve planktonik fazdaki bakteriler uzaklaştırılmıştır. Mikrotitre plakala kuyularının çeperlerine tutunmuş biyofilm örneklerinin kristal viyole bağlanma esasına göre boyanması daha önce izah edildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.2). Biyofilm ölçümünün sonucu her altı paralelde belirlenen absorbans değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca besiyeri içeren) kuyularının ortalamalarının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. pH ve sıcaklık gibi çevresel parametrelerin biyofilm üretimi üzerine olan etkileri eş zamanlı olarak sınanmıştır. Bu bağlamda ilgili deney düzeneği yine yukarıda izah edildiği şekliyle tasarlanmıştır. Farklı pH değerlerine (pH 4,0-5,0-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0-10,0-11,0) ayarlanmış (1 N NaOH, 1 N HCl ile) TSB içeren kuyulara ilgili bakterilerin inokülasyonları yapıldıktan sonra mikrotitre plakalar 45-50-55-60-65-70 °C'de statik koşullarda inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon bitiminde biyofilm üretim miktarları yine yukarıda açıklandığı şekliyle saptanmıştır. İnkübasyon sürelerinin bitiminde biyofilm üretim miktarlarını belirlemeden hemen önce (kuyuları boşaltmadan) 595 nm dalga boyunda bakterilerin tanımlanan çevresel koşullardaki mikrobiyal gelişimleri de ölçülmüştür. Bu yönüyle bakterilerin biyofilm üretim davranışları ve mikrobiyal gelişim kapasiteleri arasındaki ilişkinin tayin edilmesi amaçlanmıştır.

3.2.7 Kompleks biyofilm sistemleri içerisinde *Geobacillus/Anoxybacillus* cinsi bakterilerin etkileşimlerinin araştırılması

Seçilen 4 bakterinin (*A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermoglucosidans* B84a) her birinin tek tek ve ikili kombinasyonları (*Geobacillus/Anoxybacillus*), polistiren mikrotitre plakalarda, standart TSB besiyeri içeriğinde ve 60 °C'de kültüre alınmıştır. Belirtilen sıcaklığın ve besiyeri içeriğinin tercih edilmesinin gerekçesi, dört bakterinin ideal biyofilm üretimi için ortalama koşulları sağlamak adınadır. İnokülüm hazırlığı Yöntem 3.2.1'de belirtildiği üzere yapılmıştır. Biyofilm miktarlarının tayini ise Yöntem 3.2.2'de belirtildiği şekliyle yapılmıştır. Burmolle vd. (2006) tarafından önerilen yöntem esas alınarak ve bazı modifikasyonlarla yürütülen deneyde, kültüre alma işlemi her bakteri için farklı inokülüm oranları kullanılarak toplamda on dört farklı kombinasyonda gerçekleştirilmiştir;

- 1) % 50 inokülüm oranında **DSM 2641^T** (5 µL 6 saatlik kültür + 195 µL TSB)
- 2) % 100 inokülüm oranında **DSM 2641^T** (10 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 3) % 50 inokülüm oranında **F81** (5 µL 6 saatlik kültür + 195 µL TSB)
- 4) % 100 inokülüm oranında **F81** (10 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 5) % 50 inokülüm oranında **DSM 465^T** (5 µL 6 saatlik kültür + 195 µL TSB)
- 6) % 100 inokülüm oranında **DSM 465^T** (10 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 7) % 50 inokülüm oranında **B84a** (5 µL 6 saatlik kültür + 195 µL TSB)
- 8) % 100 inokülüm oranında **B84a** (10 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 9) % 50 inokülüm oranında **DSM 2641^T** + % 50 inokülüm oranında **F81** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 10) % 50 inokülüm oranında **DSM 2641^T** + % 50 inokülüm oranında **DSM 465^T** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 11) % 50 inokülüm oranında **DSM 2641^T** + % 50 inokülüm oranında **B84a** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 12) % 50 inokülüm oranında **F81** + % 50 inokülüm oranında **DSM 465^T** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 13) % 50 inokülüm oranında **F81** + % 50 inokülüm oranında **B84a** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB)
- 14) % 50 inokülüm oranında **DSM 465^T** + % 50 inokülüm oranında **B84a** (5 µL 6 saatlik kültür + 5 µL 6 saatlik kültür + 190 µL TSB).

3.2.8 Major (kazein-laktoz) ve minör (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) süt bileşenlerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması

Süt içeriğinde bulunan major ve minör bileşenlerin etkileri araştırılırken “Bazal Medium” içeriği modifiye edilmiştir. Bazal Medium mikrobiyal gelişim için gerekli minimal besinsel gereksinimleri bulundururken, ilave edilen bileşenin biyofilm üretimi üzerindeki etkisini doğrudan gözlemlemeye de imkan tanımaktadır. Belirtilen bileşenlerin etkileri araştırılırken, inokülasyon hazırlığı ve biyofilmlerin miktarsal tayini yukarıda anlatıldığı şekliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.1 ve 3.2.2). Major ve minör bileşenlerin Bazal Medium içerikleri modifiye edilirken, farklı standart süt tipleri içerisinde bulunan konsantrasyonlar dikkate alınmıştır (www.milkfacts.info, 2017). Konsantrasyon değerleri belirlenirken mevcut süt standartlarının dışına çıkılmamaya

özen gösterilmiştir. İnkübasyon süresi için yine 96 saat tercih edilmiş (azami biyofilm eldesi için) ve mikrotitre plakalar statik koşullarda her bir izolat ve referans bakteri için iki inkübasyon sıcaklığında (55 °C ve 65 °C) inkübe edilmiştir. Her bir bileşen ve bileşenin konsantrasyonu için 6 paralelli deney düzenekleri hazırlanmıştır.

Değerlendirmeye alınan;

Kazein konsantrasyonları; % 0,0-0,5-1,0-1,5-1,8-2,1-2,4-2,7-3,0 (pankreatik kazein hidrolizati kullanılmıştır).

Laktoz konsantrasyonları; % 0,0-0,5-1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5-4,0-4,5-5,0-5,5-6,0.

Kalsiyum konsantrasyonları;0,0-0,25-0,50-0,75-1,0-1,25-1,50-1,75-2,0 mg/mL CaCl₂

Potasyum konsantrasyonları; 0,0-0,25-0,50-0,75-1,0-1,25-1,50-1,75-2,0 mg/mL KCl

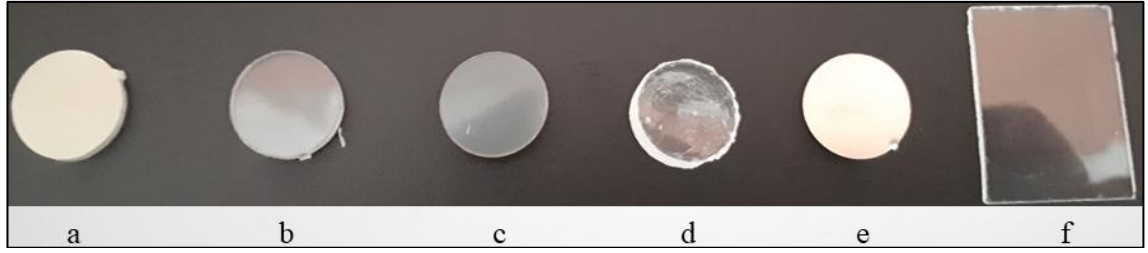
Magnezyum konsantrasyonları; 0,0-0,1-0,2-0,3-0,4 mg/mL MgCl₂

Sodyum konsantrasyonları; 0,0-0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6 mg/mL NaCl

İnkübasyon bitiminde biyofilmlerin miktarsal tayinine geçmeden önce plakalar mikrobiyal gelişimleri saptamak adına OD_{595nm}'de okutulmuştur.

3.2.9 Farklı abiyotik yüzeylerin *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin süt ortamında biyofilm üretimlerine olan etkilerinin araştırılması

İlgili çalışmada, biyofilm üretimlerinin takibi için steril standart tam yağlı süt içeriği kullanılmıştır. Çalışma, 6 kuyulu mikrotitre plaka düzeni esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Abiyotik yüzey olarak; özel olarak kestirilmiş polikarbonat, polipropilen, cam, paslanmaz çelik, polivinil klorür ve polistiren yüzeyler kullanılmıştır (R: 14 mm, her birinin toplam yüzey alanı: 3.08 cm²; cam yüzey: 4 cm²). Bu yüzeyler, biyofilm çalışmalarından önce üzerindeki olası organik kalıntıların temizlenmesi için öncelikle % 10'luk SDS ile 1 saat süresince karıştırılarak temizlenmiş ve sonra distile su ile bolca durulanmıştır. Durulama işlemini müteakip, kuponlar saf izopropanol içerisinde bir gece bekletilmiştir (Kilic vd. 2017). Bekletme işleminden sonra kuponlar yine distile su ile bolca durulanmış ve sıkıca paketlenerek 121 °C'de otoklavlanmıştır (Yöntem 3.2.5). Çalışmada kullanılan abiyotik yüzeyler (kuponlar) şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4.a Polipropilen, b. Polikarbonat, c. Polivinil klorür, d. Polistiren, e. Paslanmaz çelik, f. Cam

Çalışılan bakterilerin ve izolatların inokülasyon hazırlığı daha önce belirtildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.1). İnkülasyon hazırlığından sonra, steril abiyotik yüzeylerden birer adet (iki paralel kuyuya) 6 kuyulu mikrotitre plaka kuyularına transfer edilmiştir. Daha sonra, kuyulara aktif kültürler aşılansmış (%4 inokülüm oranı) süt örneklerinden 5'er mL transfer edilmiştir. Plakalar yine iki kritik sıcaklıkta (55-65 °C) 48 saat süresince inkübe edilmiştir. İlk 24 saatin sonunda kuyulardaki süt içerikleri boşaltılarak yenileriyle değiştirilmiş ve her bir kuyudaki kupon aseptik koşullarda tersyüz edilmiştir. Bu işlemden sonra inkübasyona devam edilmiştir. 48 saatin sonunda kuyulardaki kuponlar aseptik koşullarda çıkarılmış ve tutunmayan ve planktonik fazdaki bakterilerin uzaklaştırılması için 2 kez steril SF ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben kuponlar, 4.5'er mL steril serum fizyolojik ve 10 g cam boncuk içeren falkon tüplerine transfer edilmiştir. Tüpler azami yoğunlukta 2 dakika süresince vortekslenmiştir. Hazırlanan biyofilm süspansiyonlarından bir seri dilüsyon işlemi (10^{-1} - 10^{-6}) sonrası sayım işlemine geçilmiştir (Kilic vd. 2017). Sayım işlemi için damla plak yöntemi esas alınmıştır. Dilüsyonlar MI agar besiyerine inoküle edilmiş ve petriler 24 saat süresince 55 °C'de inkübe edilmiştir. İnkülasyon bitiminde, petrilerdeki ideal dilüsyonlarda gelişen koloniler damla plak yöntemiyle sayılmış ve sayım sonuçları logaritmik ölçeğe çevrilerek istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

3.2.10 Farklı yağ içeriğine sahip inek sütlerindeki *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin biyofilm üretim kapasiteleri ve sporulasyon kinetikleri

İlgili çalışma bir önceki deney düzeneği esas alınarak tasarlanmıştır. Bir önceki çalışmadan farklı olarak; her bir bakteri için iki farklı inkübasyon sıcaklığındaki ideal abiyotik yüzeylerin seçimi ve piyasada satışta sunulan farklı yağ içeriğine [Tam yağlı süt

(% 3.0 yağ), yarım yağlı süt (% 1.5 yağ), yağsız süt (% 0.1 yağ)] sahip standart inek sütleri kullanılmıştır. Piyasada satışa sunulan standart ve farklı yağ içeriklerine sahip uzun ömürlü sütler (UHT) her ne kadar steril olsalar da çalışmalardan önce tedbiren 121 °C’de 5 dakika süresince otoklavlanmıştır. Biyofilm üretimlerinin tespiti için bir önceki çalışmanın yöntemindeki (Yöntem 3.2.9) basamaklar takip edilirken; spor sayımları için hazırlanan biyofilm süspansiyonları 100 °C kaynar su banyosunda 15 dakika süresince muamele edilmiştir. Isıl işlemten sonra spor sayım işlemleri yine daha önce damla plak yönteminde belirtildiği şekliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.9).

3.2.11 *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşlarının statik koşullarda ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında zamana bağlı biyofilm üretim yanıtlarının belirlenmesi

Bu çalışmada iki referans suşun (*A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T) 316 L tipi paslanmaz çelik yüzeylerde, farklı inkübasyon sıcaklıklarında zamana bağlı olarak biyofilm üretim yanıtlarının saptanması amaçlanmıştır. İlgili çalışma, sonraki aşamada “biyofilm giderim” stratejilerinin değerlendirileceği çalışmalarda, zamana bağlı olarak hangi noktada giderim için müdahale edilmesi gerektiği hususunda fikir vermesinin yanı sıra uzun süreli bir inkübasyon sürecindeki biyofilm oluşum kinetiklerinin açıklığa kavuşturulması açısından da kritik verilerin elde edilmesi adına önem arz etmektedir. Bu bağlamda çalışılan iki referans suşun üç kritik sıcaklıkta (55-60-65 °C) ve farklı inkübasyon sürelerinde (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 saat) standart tam yağlı süt içerisindeki paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm örneklemeleri yapılmıştır. İlgili çalışmada biyofilm üretimlerinin takibi için steril standart tam yağlı süt içeriği (% 10’luk sulandırılmış “skim milk”) kullanılmıştır. Çalışma, 6 kuyulu mikrotitre plaka düzeni esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Abiyotik yüzey olarak; özel olarak kestirilmiş paslanmaz çelik (316 L tipi) yüzeyler tercih edilmiştir (R: 7 mm, toplam yüzey alanı; 3.08 cm²). Bu yüzey, biyofilm çalışmalarından önce üzerindeki olası organik kalıntıların temizlenmesi için ve sterilize edilmesi için birtakım işlemlerden geçirilmişlerdir (Yöntem 3.2.5).

Çalışılan bakterilerin ve izolatların inokülasyon hazırlığı daha önce belirtildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.1). İnokülasyon hazırlığından sonra, steril paslanmaz

yüzeylelerden birer adet (iki paralel kuyuya) alınarak 6 kuyulu mikrotitre plaka kuyularına transfer edildi. Kuyulara daha sonra aktif kültürler aşılınmış (% 4 inokülasyon oranı) süt örneklerinden 5'er mL transfer edilmiştir. Plakalar belirtilen sıcaklıklarında ve sürelerinde inkübe edilmiştir. Belirtilen her bir inkübasyon süresinin sonunda, kuyulardaki kuponlar aseptik koşullarda çıkarılarak biyofilm süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan bir seri dilüsyon (10^{-1} - 10^{-6}) yapılarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.9).



Şekil 3.5 Altılı mikrotitre plaka düzeni. Tam yağlı süt içeren kuyularda çalışılan abiyotik yüzeyler bulunmaktadır

3.2.12 Termofilik biyofilmlerin karbohidrat içeriklerinin belirlenmesi

Termofilik biyofilm matriksindeki polimer içeriklerinin tayini için çalışma kapsamına alınan *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin (*A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81) ve *Geobacillus* cinsi üyelerinin (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermoglucosidans* B84a) biyofilm üretebildikleri en ideal koşullar dikkate alınmıştır (Çizelge 3.32).

Çizelge 3.32 Çalışma kapsamındaki referans suşların ve izolatlarının ideal biyofilm üretim koşulları

Referans suş/ izolat adı	İdeal tuz içeriği (% NaCl)	İdeal pH değeri	İdeal inkübasyon sıcaklığı
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	0,0	7,5	55 °C
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81	1,5	8,5	55 °C
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 2641 ^T	1,0	7,5	65 °C
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a	0,5	6,5	55 °C

Tanımlanan koşullarda 96 saat süresince TSA üzerinde geliştirilen biyofilm örnekleri inkübasyon süresi sonunda aseptik koşullarda toplanarak önceden darası alınmış 15 mL'lik steril Falcon tüplerine transfer edilmiş ve toplanan biyofilm örneklerinin yaş kütlesi tartılmıştır. Tartım işleminden sonra tüplerin her birine 3 mL steril SF (Serum Fizyolojik) ve 5 g cam boncuk ilave edilmiştir. Tüpler en yüksek devirde 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Vorteks aşamasından sonra tüpler 6000 rpm'de +4 °C'de 15 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj basamağından sonra süpernatantların yaklaşık 2.5 mL'si temiz tüplere transfer edilmiştir. Son olarak olası hücre ve hücre kalıntılarından süpernatantı ayırıştırmak için fazlar 0,22 µm por çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Fransa) geçirilmiştir. Filtratlar daha sonra tayin işlemlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

EPS bileşeninde bulunan karbonhidrat miktarının tayini, fenol-sülfürik asit metodu ile gerçekleştirilmiştir (Dubois vd. 1956). Serbest metil eterleri veya potansiyel olarak serbest indirgeyici gruplar içeren basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve onların türevleri, fenol ve konsantre sülfürik asit ile muamele edildiğinde portakal-sarı renk verir. Bu reaksiyon çok duyarlı olup renk sabit kalır. Kullanılan bu fenol-sülfürik asit metodu şekerlerin ve ilgili maddelerin çok düşük miktarlarını dahi saptayabilmektedir (Dubois vd. 1956). Cam tüplere, 1 mL örnek, 0,5 mL % 5'lik fenol (Merck 1.00206), 5 mL derişik sülfürik asit (Merck 1.00713) eklenmiştir. Tüpler, oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra iyice vortekslenmiş ve 30 °C'lik etüvde 20 dk

bekletilmiştir. Meydana gelen portakal-sarı renk değişimi, OD_{490nm} 'de okutulmuştur. Standart eğri elde etmek için 5, 10, 25, 35, 50, 60, 75, 85, 100 $\mu g/mL$ olacak şekilde glukoz çözeltileri hazırlanarak fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Standart eğri yardımıyla Eliza'da okunan absorbans değerine karşılık gelen karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır. Kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli yürütülmüştür.

3.2.13 Termofilik biyofilmlerin protein içeriklerinin belirlenmesi

EPS bileşenlerden olan, protein içeriğinin tayini için Lowry vd. (1951) tarafından tanımlanmış metod modifiye edilerek çalışılmıştır. Buna göre, ependorf tüplerine 1 mL örnek, 3 mL C reaktifi (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşur) eklenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, 300 μL folin-fenol reaktifi (Sigma F9252) eklendikten sonra vortekslenmiştir. Örnek tekrar oda sıcaklığında 45 dk bekletilmiş ve OD_{660nm} 'de okutulmuştur. Kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür.

Standart eğri elde etmek için, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 ve 0.1562 mg/mL oranlarında dilüsyon yapılarak BSA çözeltileri hazırlanmış ve Lowry metodu uygulanmıştır. Standart eğri yardımıyla Eliza'da okunan absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı hesaplanmıştır. Protein miktar tayininde tüm örnekler 3 paralelli çalışılmıştır.

3.2.14 Termofilik biyofilmlerin eDNA içeriklerinin belirlenmesi

EPS bileşenlerden olan eDNA izolasyonu için öncelikle filtre edilen üst faza, 750 μL kloroform-izoamil alkol (24:1 oranında) eklenmiştir. 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz yeni bir ependorfa alınmıştır. Üzerine 750 μL fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1 oranında) eklenerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazın üzerine hacminin 0,6'sı (yaklaşık 350 μL) kadar izopropanol eklenmiştir. -20 °C'de 20 dk bekletilmiş ve tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülmüş, çökelti üstüne 350 μL % 70'lik soğuk etanol eklenmiştir.

Tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifuj edilmiştir. eDNA içeren pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra 30 µL Tris-EDTA (TE) tamponu ile çözülerek üzerine 5 mg/mL'lik RNaz A'dan (Sigma R6513) 4 µL eklenmiş ve 37 °C'de 45 dk bekletilmiştir (Wilson 1987). eDNA konsantrasyonu (ng/µL) ve saflığı için 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazı (Thermo Scientific NanoDrop Lite) ile ölçülmüştür. Daha sonra, örnekler 1,5 µL etidyum bromür (Sigma E-8751) içeren % 1,5'luk agaroz (Sigma A9539) jel elektroforezinde 120 V'da 1 saat yürütülmüş ve UV translüminatör ile görüntülenmiştir. eDNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kilobaz (kb) cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.15 eDNA'nın termofilik basillerin gelişmekte olan biyofilmleri üzerindeki yapısal ve fonksiyonel rollerinin araştırılması

eDNA'nın gelişmekte olan termofilik biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılmasında öncelikle daha önce de belirtildiği şekliyle inokülasyon hazırlığı yapılmıştır (Yöntem 3.2.1). Çalışmada hücre dışı ortama salınan DNA'nın degradasyonu için DNaz I enzimi kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, Almanya). Kullanılan bu enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 37 °C olmasından ötürü enzimin doğrudan kültür ortamına ilave edilerek biyofilm örneklemesinin termofilik sıcaklıklarda (60 °C) gerçekleştirilmesi mümkün olmamıştır. Bu handikapın aşılması adına, inokülasyon hazırlığının son aşamasındaki 6 saatlik kültürler (5 mL) son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde DNaz I enzimi uygulanarak kültürler 60 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona kaldırılmıştır. İnokülasyonun son basamağındaki kültür aktivasyonu her bir referans suş ve izolat için daha önce saptanmış ideal tuz (NaCl), pH ve sıcaklık gereksinimlerine göre gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak da enzim ihtiva etmeyen kültürler de yine aynı koşullarda inkübasyona kaldırılmıştır. İnokülasyon sonunda test ve kontrol gruplarından 200'er µL olacak şekilde (4 paralel) mikrotitre plaka kuyularına transfer edilmiştir. Plakalar her bir referans suş ve izolatin biyofilm üretimleri için yine daha öncesinde saptanan ideal inkübasyon sıcaklıkları esas alınarak, statik koşullarda, 24, 48 ve 96 saat sürelerince bekletilmiştir. İlgili çalışmada yine *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşları ile, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *G. thermoglucosidans* B84a

izolatları değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma dahilindeki referans suşların ve izolatların ideal biyofilm üretim koşulları dikkate alınmıştır (Çizelge 3.32). Her bir inkübasyon süresinin sonunda plakalara yine daha önce detayları belirtildiği üzere kristal viyole bağlanma uygulaması yapılarak biyofilm üretim miktarları saptanmıştır (Yöntem 3.2.2).

eDNA'nın olgun termofilik biyofilmler üzerindeki yapısal etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise; mikrotitre plakalarına, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, % 10'luk sulandırılmış süt tozu (tam yağlı standart süt içeriği) içeriğinde 190 µL ve son aktif kültürden 10 µL eklenerek, optimum koşullarda 48 saat (*Anoxybacillus* üyeleri için) ve 72 saat (*Geobacillus* üyeleri için) sürelerince, 60 °C'de ve statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki besiyerleri boşaltılmış ve bağlanmayan hücreler ile hücre kalıntılarını gidermek için kuyular iki defa SF (Serum Fizyolojik; % 0,9 NaCl) ile yıkanmıştır. Daha sonra, kuyularda tutunan biyofilmler, DNaz I enzimi (100 µg/mL; 200 µL) ile 1, 2 ve 4 saat sürelerince muamele edilmiş ve 37°C'de inkübasyona kaldırılmıştır. Kontrol kuyularına ise yalnızca enzim tamponu transfer edilerek aynı işlem uygulanmıştır. Enzim muamelesi sonrasında kuyular boşaltılmış ve bu sefer enzim kalıntılarını gidermek için kuyular yine 2 defa SF ile yıkanmıştır. Ardından, biyofilmlerin miktarını belirlemek üzere kuyuların kristal viyole ile boyanması sonrası, tutunan biyofilmlere bağlanan boya miktarı Eliza'da spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Yöntem 3.2.2). DNaz I enziminin etkinliğine bağlı olarak biyofilm miktarında meydana gelecek olası değişimler $[(C-B)-(T-B)] / [(C-B)] \times 100$ formülü esas alınarak hesaplanmıştır (C; biyofilm içeren kontrol kuyuları, B; sadece besiyeri içeren kuyular, T; kimyasal veya enzim ile muamele edilmiş kuyular), (Pitts vd. 2003).

3.2.16 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında tam yağlı süt ihtiva eden ortamlarda geliştirilen termofilik biyofilmlerin çeşitli sanitasyon ajanlarıyla giderimi

İlgili çalışmada, antibakteriyel ve antioksidan ajanlar, proteaz enzimleri, polisakkarit giderici ve parçalayıcı ajanlar ile sinyal reseptörlerini inhibe eden ajanlar (yeter sayı algılama sinyalizasyonunun inhibisyonu) gibi çok çeşitli amaçlarda 15 farklı sanitasyon ajanı kullanılmıştır. Söz konusu ajanların etkin dozlarının saptanmasında ve

uygulanmasında çizelge 3.33'te referans edilen konsantrasyonlar ve süreler tercih edilmiştir. Değerlendirilen giderim işlemleri, çeşitli sanitasyon ajanlarının kullanım miktarına, sıcaklığına ve süresine bağlı olarak ayarlanmıştır. Kontrol grubu, biyofilm örneğinin sanitasyon ajanı ile muamele edilmediği kuyular olarak kabul edilmiştir. Giderim çalışmalarında mikrotitrasyon plakalarının kuyularına, 190 µL tam yağlı standart süt içeriğine aktif kültürden 10 µL eklenerek, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, her bir referans ve izolat için optimum koşullarda (48 saat, 60 °C *Anoxybacillus* üyeleri; 72 saat, 60 °C *Geobacillus* üyeleri için) statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki besiyerleri boşaltılmış ve kuyu çeperlerine bağlanmayan bakteriler ile hücre kalıntılarını gidermek için kuyular iki defa SF ile yıkanmıştır (Yöntem 3.2.2). Daha sonra, kuyularda tutunan biyofilmler, kimyasallar veya enzimler ile daha önce tanımlandığı haliyle muamele edilmiştir. Sonrasında kuyular boşaltılmış ve bu sefer ajanların kalıntılarını gidermek için kuyular yine 2 defa SF ile yıkanmıştır. Ardından, biyofilmlerin miktarını belirlemek üzere daha önce detayları belirtildiği şekliyle kristal viyole ile boyanması sonrası, tutunan biyofilmlere bağlanan boya miktarı Eliza'da spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Yöntem 3.2.2). Uygulanan kimyasal temizleme rejiminin başarısı, biyofilmlere uygulanan her bir kimyasal veya enzim için % giderim oranı cinsinden hesaplanmıştır. Sanitasyon ajanının etkinliğine bağlı olarak biyofilm miktarında meydana gelecek olası değişimler $[(C-B)-(T-B)] / [(C-B)] \times 100$ formülü esas alınarak hesaplanmıştır (C; biyofilm içeren kontrol kuyuları, B; sadece besiyeri içeren kuyular, T; kimyasal veya enzim ile muamele edilen kuyular), (Pitts vd. 2003). İlgili çalışmada *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G.thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşları ile, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *G. thermoglucosidans* B84a izolatları değerlendirmeye alınmıştır.

Çizelge 3.33 Çalışmada kullanılan sanitasyon prosedürleri ve kullanım amaçları

Kimyasal – Enzimatik Ajanlar	Marka ve kodları	Referansta uygulanan ajan miktarı	Tezde çalışılan miktar	Çözüldüğü tampon	Ortam sıcaklığı	Süre	Referans
Karbonhidratlara etki eden ajan							
Sodyum metaperiodat	Sigma 71859	50 mM	100 mM	dH ₂ O	22 °C	60 dk	Parkar vd. 2003
Makromolekülleri çöktüren ajan							
Trikloroasetik asit	Sigma 27242	% 10	% 10	dH ₂ O	100 °C	15 dk	Parkar vd. 2003
Hücre duvarı bütünlüğünü bozan ajan							
Lizozim	Sigma L-7651	% 2	% 2	10 mM Tris-HCl	37 °C	60 dk	Parkar vd. 2003
Proteinleri parçalayan ajan							
Sodyum dodesil sülfat	Sigma L-5750	% 2	% 3	dH ₂ O	100 °C	10 dk	Parkar vd. 2003
Tripsin	Sigma T2600000	% 2	% 3	50 mM Tris-HCl	37 °C	3 saat	Parkar vd. 2003
Pro-oksidadanlar							
Potasyum monopersülfat	Sigma 228036	1 mg/mL	2 mg/mL	SF	22 °C	30 dk	Parkar vd. 2003
Sodyum tiyosülfat	Sigma 72049	9 mg/mL	10 mg/mL	dH ₂ O	22 °C	5 dk	
Antibakteriyel bakteriyosin ajan							
Nisin	Sigma N5764	1 mg/mL	2 mg/mL	0.02 N HCl	37 °C	24 saat	Boziaris ve Adams 1999
Enzime dayalı temizleyiciler							
a. Proteaz ajanları							
Alkalen proteaz	Sigma P4860	% 0,08	0,16 U/g	50 mM Glisin-NaOH	37 °C	60 dk	Parkar vd. 2004
Subtilizin	Sigma P5380	% 0,5	% 1	0.1 M Borat, 0.1 M CaCl ₂	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
b. Polisakkarit parçalayan ajanlar							
α -Amilaz	Sigma A4551	% 0,5	% 1	20 mM Sodyum fosfat, 6.7 mM NaCl	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
Selülaz	Sigma C1184	% 0,3	% 1.66	50 mM Sodyum asetat	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
Bakteriler arası iletişimi engelleyen ajanlar							
a. Sinyal reseptörleri inhibe edenler							
Furanon	Sigma 283754	1 mg/mL	1 mg/mL	dH ₂ O	22 °C	60 dk	Ponnusamy vd. 2010
b. Sinyal molekülü yapımını engelleyenler							
Triklolan*	Sigma PHR1338	1 mg/mL	2 mg/mL	% 50 Etanol	22 °C	60 dk	Tabak vd. 2007

3.2.17 Statik-dinamik koşullarda ve süt ortamında termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerinin karşılaştırılması ve sanitasyon stratejilerinin termofilik biyofilmler üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi

İlgili çalışmada sadece *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşları kullanılmıştır. Her iki referans suş için de daha önceki çalışmalarda süt ortamında biyofilm üretimleri için belirlenen en ideal iki abiyotik yüzey, biyofilm örneklemelemlerinin yapılması için tercih edilmiştir (Çizelge 3.34).

Çizelge 3.34 İlgili çalışmada referans suşlar için biyofilm örneklemesinde tercih edilen abiyotik yüzeyler

Abiyotik Yüzeyler		
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	Paslanmaz çelik	Polistiren
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	Paslanmaz çelik	Cam

Her iki referans suş için de biyofilm örneklemelemleri standart tam yağlı süt içerisinde yapılmıştır. İnokülasyon hazırlığı yine daha önce belirtildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.1). İnokülasyon hazırlığını takiben, her bir referans suş için ideal olan steril abiyotik yüzeylerden birer adet (iki paralel kuyuya) alınarak 6 kuyulu mikrotitre plaka kuyularına transfer edilmiştir. Kuyulara daha sonra aktif kültürle aşılınmış (% 4) süt örneklerinden 5'er mL eklenmiştir. Plakalar 60 °C'de (her iki referans için de ideal inkübasyon sıcaklığı) her bir referans suş için daha önceki çalışmalarda saptanmış farklı inkübasyon sürelerindeki biyofilm üretimleri göz önünde bulundurularak seçilen sürelerde (*A. flavithermus* DSM 2645^T için; 5, 24 ve 48. saatler, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için; 2, 24 ve 72. saatler) esas alınarak inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon işlemi sonrası biyofilm örneklerindeki hücrelerin sayım işlemi yine daha önce tanımlandığı haliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.9).

Dinamik koşullardaki biyofilm örneklemelemleri için laboratuvar ekibimizce daha önce tasarlanmış olan modifiye CDC (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) reaktörü

kullanılmıştır (Kilic vd. 2017). Söz konusu reaktör 600 mL reaksiyon kapasitesine sahiptir. Biyofilm örneklemelerinin yapıldığı 7 mm yarıçaplı abiyotik yüzeylerin (Toplam yüzey alanı; 3.08 cm²) yerleştirilebildiği üç gözeli toplam 4 adet teflon taşıyıcı bulundurmaktadır. Reaktöre ayrıca 2x2.5 cm ebatlarında dikdörtgen cam yüzeyleri taşıyacak nitelikte “slide” taşıyıcılar da entegre edilebilmektedir. Reaktördeki dinamik koşullar, manyetik tabla üzerinde sirküler akım aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

Dinamik koşullardaki biyofilm örnekleme için ilgili inokülasyon hazırlığı yine daha önce tanımlandığı şekliyle yapılmıştır. İçerisinde 576 mL standart tam yağlı süt içeren ve tüm aksamıyla birlikte sterilize edilen reaktör sistemine inokülasyon sonunda her bir referans suşun kültüründen toplam 24 mL aşılama yapılarak % 4'lük bir inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Reaktör dinamik koşullarda (manyetik tabla yerleştirilmiş inkübatör; 170 rpm) her bir referans suş için belirtilen inkübasyon sürelerinde ve sıcaklıklarında (60 °C) inkübe edilerek, bu sürelerin sonunda aseptik koşullarda her bir abiyotik yüzeyden ikişer adet alınmış ve biyofilm hücrelerinin sayımı için daha öncesinde tanımlanan işlemler tekrar edilmiştir. Son olarak statik ve dinamik koşullarda yapılan biyofilm örneklerinden elde edilen sayım sonuçları logaritmik ölçekte kıyaslanmıştır. Reaktör düzeneği şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6.a Çalıştırılmaya hazır reaktör, b. Farklı abiyotik yüzeyleri tutan taşıyıcılar

Statik ve dinamik koşullarda iki referans suşun biyofilm üretim kapasitelerinin karşılaştırılmasının yanı sıra, eş zamanlı olarak daha önceki biyofilm giderim çalışmalarına göre belirlenen etkin sanitasyon stratejileri de biyofilm hücrelerinin elimine edilmesi ve biyokütlenin giderilmesi üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi adına değerlendirilmiştir. Bu aşamada **statik koşullarda elde edilen biyofilm örnekleri** sanitasyon uygulamasına tabi tutulmuştur. Kontrol grubu olarak sanitasyon stratejisi uygulanmayan abiyotik yüzeylerden elde edilen biyofilm hücre sayımları esas alınmıştır. Söz konusu çalışma kapsamında etkinlikleri değerlendirilen sanitasyon ajanları çizelge 3.35’te verilmiştir. Bu sanitasyon ajanlarının seçiminde daha önce mikrotitre plakalarda geliştirilen termofilik biyofilmlere uygulanan 15 farklı sanitasyon ajanından elde edilen sonuçlar esas alınmıştır.

Çizelge 3.35 Çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan sanitasyon ajanları

Sanitasyon Stratejileri			
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	Tripsin (% 3)	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	Tripsin (% 3)
	Alkalen proteaz (0,16 U/g)		Alkalen proteaz (0,16 U/g)
	Trikloro asetik asit (TCA) (% 10)		Trikloro asetik asit (TCA) (% 10)
	Sodyum dodesil sülfat (SDS) (% 3)		Sodyum dodesil sülfat (SDS) (% 3)
	Furanon (1 mg/mL)		Furanon (1 mg/mL)
	Lizozim (% 2)		Lizozim (% 2)
	Selülaz (%1,66)		Selülaz (%1,66)
	α -amilaz (% 1)		α -amilaz (% 1)

Sanitasyon stratejilerinin biyofilm hücrelerinin ve biyokütellerinin giderimleri üzerindeki toplam etkinliklerinin saptanmasının yanı sıra, ilgili stratejilerin biyofilm sistemi içerisindeki termofilik sporların giderimi üzerindeki etkinlikleri de değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, kontrol ve test gruplarından (sanitasyon stratejisi uygulanmış abiyotik yüzeyler) hazırlanmış biyofilm süspansiyonları 15 dakika süresince vejetatif formdaki bakteri hücrelerinin elimine edilmesi için kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemten sonra yine bir seri seyreltme (10^{-1} - 10^{-6}) işlemi

yapılarak daha önce belirtildiği şekliyle sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Yöntem 3.2.10).

3.2.18 *A. flavithermus* DMS 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DMS 465^T suşlarının biyofilm üretimleri için en ideal iki abiyotik yüzeyde dinamik koşullarda oluşturduğu biyofilmlere sanitasyon işlemlerinin uygulanması ve CLSM (Konfokal Lazer Mikroskopisi) Analizleri

Termofilik basillerin standart tam yağlı süt içeriğinde dinamik koşullar dahilinde statik koşullara nispeten daha yoğun bir şekilde biyofilm üretebildikleri daha önceki çalışmalarda elde edilen bulgulara dayanarak söylenebilmektedir (Kilic vd. 2017). Bu çalışmada ise her bir referans için yine biyofilm üretimleri itibarıyla, daha önce tanımlanmış iki ideal abiyotik yüzey (Çizelge 3.34) kullanılmıştır. Her bir abiyotik yüzey için bir önceki çalışmanın sonuçlarına dayanarak sadece en etkin bulunan birer sanitasyon ajanı seçilmiştir (Çizelge 3.36).

Çizelge 3.36 Çalışma kapsamında uygulanan koşullar (abiyotik yüzeyler-sanitasyon ajanları)

Abiyotik yüzey-Sanitasyon ajanı		
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	Paslanmaz çelik-Sodyum dodesil sülfat	Polistiren-Trikloro asetik asit
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	Paslanmaz çelik-Trikloro asetik asit	Cam-Proteaz

Konfokal Lazer Mikroskopisi analizlerinden önce, dinamik koşullarda yoğun biyofilm üretimine bağlı olarak suşların biyofilm örneklemeleri yapılırken inkübasyon süreleri daha kısa tutulmuştur (*A. flavithermus* DSM 2641^T için; 60 °C’de 5., 12. ve 18. saatler, *G. thermodenitrificans* DSM^T 465 için; 60 °C’de 2. 12. ve 18. Saatler). Zira ilk denemeler dahilinde dinamik koşullarda uzun süreli inkübasyon süreleri sonucunda (18 saat <) hazırlanan biyofilm örneklerinin analizi azami ölçüde artan biyofilm kalınlığına bağlı olarak Konfokal Lazer Mikroskopisi’nin analizlerinde, özellikle kesit analizlerinde, sağlıklı bir şekilde inceleme yapılmasını engellemektedir. Biyofilm örneklemesi, sanitasyon uygulamaları ve sayım işlemleri daha önce belirtildiği şekliyle yapılmıştır (Yöntem 3.2.17).

Sanitasyon uygulamaları sonucunda gerçekleştirilen sayım işlemlerinin paralelinde, aynı örneğe uygulanan sanitasyon işleminin mikroskopik değerlendirmeleri için de Konfokal Lazer Mikroskopisi çalışmaları yürütülmüştür. Sanitasyon işlemi öncesi ve sonrası CLSM ile incelenecek abiyotik yüzeyler yıkama işlemini müteakip 5 μM Syto 9 (Molecular probes, S34854) ve 15 μM Propidium iodide (PI, Molecular probes, P1304MP) ile boyandıktan sonra, 30 °C'lik etüvde karanlık bir ortamda 20 dk bekletilmiş ve inkübasyon sonrasında distile su ile yıkanmıştır (Bridier vd. 2010, Grande vd. 2010). Syto 9 boyası (floresan uyarı: 488 nm, emisyon: 498 nm), direk olarak canlı hücrelerle etkileşime girerek yeşil floresan ışık verirken, PI (floresan uyarı: 543 nm, emisyon: 617 nm), hücre zarı zarar görmüş ölü hücreler tarafından emilerek onların kırmızı spektrumunda floresan özellik göstermelerini sağlar (Vilain vd. 2009). PI aynı zamanda biyofilm matriksindeki hücre dışı DNA'ların da her iki floresan boyanın karışımı sarımsı bir renk ile boyanmasında da fonksiyon gösterir (Mulcahy vd. 2008). Boyama işleminden sonra, yüzeyler steril distile su ile iki kere yıkandıktan sonra, CLSM ile incelenene kadar karanlıkta 4 °C'de saklanmıştır (Kolari vd. 1998). Çalışmada, Syto 9 ve PI boya ile boyanmış ve bakteri inoküle edilmemiş yüzeyler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Biyofilm örnekleri Carl Zeiss marka ve LSM 510 model CLSM ile incelenmiştir. Çalışmada Plan-Neofluar 40X/1.3 DIC objektif lensleri kullanılmıştır. Syto 9'un yeşil floresanı 488_{nm}'de argon lazer kaynağı, PI'nın ise kırmızı floresanı 543 nm'de helyum/neon lazer kaynağı kullanılarak uyarılmıştır. İki lazer kaynağını ayırmak için floresan iki farklı diakronik aynada BP 488/543 and LP 585 nm'de kaydedilmiştir. Biyofilm örneği için iki (yalnız x veya y eksenini: 230.34 x 230.34 μm) veya üç boyutlu yatay düzlem (x: 230.34 μm , y: 230.34 μm ve z eksenini: 4 μm) görüntülerini içeren her bir preparattaki mikroskopik alanlar belirlenmiştir. CLSM ile görüntülenen alanlarda, canlı/ölü hücre yoğunlukları ve üç boyutlu biyofilm kalınlıkları da (μm) ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Tez Çalışmasının Başlangıcındaki Ön Çalışmalar Kapsamında *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Cinsi İzolatların ve Referans Suşların Biyofilm Üretim Potansiyellerine Göre Taranması

Ön çalışmalarda, 20 *Geobacillus* ve 84 *Anoxybacillus* referans suşun ve izolatın, biyofilm üretim kapasitelerini belirlemek üzere polistiren mikrotitrasyon plaklarındaki biyofilm üretim potansiyelleri saptanmıştır. Mikrotitrasyon plaka kuyuları üzerinde gelişen biyofilmlerin kristal viyole boyasını bağlama esasına dayanan bu yaklaşım, biyofilm üreticisi izolat ve referansların tespiti için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. İlk etapta çalışılacak olan tüm bakterilerin biyofilm üretim kapasitesi, söz konusu bakterilerin ideal olarak gelişebildiği TSB besiyerinin standart içeriğine (% 0,5 NaCl katkılı) ve NaCl katkısız içeriğine göre belirlenmiştir. Yürütülen çalışmalarda, besiyeri ozmolaritesinin biyofilm üretimi üzerinde majör bir fizyolojik etken olmasından ötürü tuz içeriğine göre iki farklı besi ortamının kullanılması gerektiği saptanmıştır. Besiyeri ozmolaritesinin yanı sıra, inkübasyon süresi (48 saat ve 96 saat) ve sıcaklık gibi (55 °C ve 65 °C) temel çevresel faktörlerin de bu bakterilerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışılan tüm bakterilerin NaCl içeren ve içermeyen TSB besiyelerindeki, farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki ve 48-96 saatlik inkübasyon süreleri sonundaki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgede ayrıca daha önce “Yöntem 3.2.2” dahilinde tanımlandığı haliyle “cut-off” değerlerine göre izolatların ve referans suşların biyofilm üretim karakteristikleri de tanımlanmıştır. Farklı besiyeri içeriği, inkübasyon süresi ve sıcaklığına göre termofilik basiller biyofilm üretim kapasitelerine göre; “güçlü”, orta düzey”, “zayıf” ve “üretici olmayan” şeklinde kategorize edilmiştir.

Çizelge 4.1 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri

GEOBACILLUS																	
Laboratuvar Kodu	İzolat/Referans Adı	48 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri	
A353	<i>Geobacillus sp.</i>	0,024	UD	0,000	UD	0,003	UD	0,014	UD	0,210	G	0,265	G	0,109	O	0,231	G
C304	<i>Geobacillus sp.</i>	0,048	UD	0,004	UD	0,000	UD	0,011	UD	0,081	Z	0,118	O	0,042	UD	0,078	Z
D413	<i>Geobacillus sp.</i>	0,007	UD	0,051	Z	0,097	Z	0,528	G	0,196	O	0,575	G	0,374	G	0,862	G
E173b	<i>Geobacillus sp.</i>	0,034	Z	0,063	Z	0,119	O	0,019	UD	0,046	Z	0,121	O	0,021	UD	0,077	O
DSM 7263 [†]	<i>G. kaustophilus</i>	0,118	O	0,024	UD	0,073	O	0,233	O	0,342	G	0,729	G	0,205	G	2,964	G
A113	<i>G. stearothermophilus</i>	0,040	UD	0,182	G	0,008	UD	0,018	UD	0,132	O	0,103	G	0,089	Z	0,132	O
DSM 22 [†]	<i>G. stearothermophilus</i>	0,002	UD	0,009	UD	0,054	UD	0,004	UD	0,024	UD	0,029	UD	0,027	UD	0,011	UD
ATCC 43223 [†]	<i>G. stearothermophilus</i>	0,000	UD	0,032	UD	0,064	Z	0,020	UD	0,128	O	0,051	UD	0,048	UD	0,044	O
DSM 5934 [†]	<i>G. stearothermophilus</i>	0,005	UD	0,013	UD	0,105	Z	0,010	UD	0,109	Z	0,067	Z	0,028	UD	0,031	O
DSM 22625 [†]	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,035	UD	0,059	O	0,005	UD	0,037	Z	0,112	O	0,068	O	0,068	Z	0,058	Z
DSM 465 [†]	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,031	UD	0,061	UD	0,021	UD	0,047	UD	0,336	G	1,332	G	0,067	O	0,542	G
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,016	UD	0,052	UD	0,003	UD	0,031	UD	0,045	O	1,690	G	0,047	Z	0,535	G
DSM 22628 [†]	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	0,010	UD	0,040	UD	0,042	UD	0,031	UD	0,040	UD	0,297	G	0,043	UD	0,066	Z
DSM 22629 [†]	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	0,002	UD	0,037	UD	0,035	UD	0,008	UD	0,302	G	0,136	O	0,071	Z	0,105	G
DSM 2542 [†]	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,007	UD	0,023	UD	0,141	O	1,041	G	0,192	O	0,121	O	0,040	UD	0,096	G
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,315	G	0,030	UD	0,018	UD	0,118	Z	0,033	Z	0,346	O	0,067	O	0,283	O
DSM 5366 [†]	<i>G. thermoleovorans</i>	0,023	UD	0,013	UD	0,015	UD	0,047	UD	0,054	O	0,366	O	0,026	UD	0,237	O
E134	<i>G. toebii</i>	0,158	G	0,032	UD	0,101	Z	0,148	G	0,413	G	0,545	G	0,059	Z	0,340	G
DSM 14590 [†]	<i>G. toebii</i>	0,035	UD	1,873	G	0,020	UD	0,216	O	0,242	G	1,932	G	0,247	G	3,911	G
DSM 13174 [†]	<i>G. vulcanii</i>	0,034	UD	0,008	UD	0,020	UD	0,033	UD	0,094	G	0,442	G	0,079	O	1,382	G

Çizelge 4.1 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS																	
Laboratuvar Kodu	İzolat/Referans Adı	48 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri	
A3210	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,045	UD	0,002	UD	0,027	UD	0,051	Z	0,828	G	0,287	G	0,029	UD	0,076	O
A321	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,035	UD	0,000	UD	0,018	UD	0,000	UD	0,016	UD	0,088	UD	0,019	UD	0,154	UD
E184aa	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,053	UD	0,025	UD	0,053	Z	0,105	O	0,038	UD	0,114	Z	0,125	Z	0,150	G
E184ab	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,026	Z	0,086	O	0,067	Z	0,037	Z	0,054	UD	0,029	UD	0,015	UD	0,028	Z
E208a	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,005	UD	0,026	UD	0,039	UD	0,000	UD	0,028	UD	0,020	UD	0,002	UD	0,008	UD
DSM 15939 [†]	<i>A. amylolyticus</i>	0,285	G	0,126	Z	0,397	G	2,012	G	0,153	G	0,103	Z	0,014	UD	0,270	O
NCIB 13972 [†]	<i>A. ayderensis</i>	0,238	G	4,000	G	0,059	Z	4,000	G	0,071	O	0,196	Z	0,050	Z	0,153	Z
A142	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,065	Z	1,398	G	0,042	Z	1,090	G	0,008	UD	0,114	Z	0,118	Z	0,524	G
A146	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,069	Z	0,546	G	0,011	UD	0,021	UD	0,012	UD	0,029	Z	0,097	Z	0,166	O
A335	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,037	UD	0,009	UD	0,009	UD	0,020	UD	0,090	Z	0,093	G	0,079	Z	0,099	O
A392b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,045	Z	0,012	UD	0,022	Z	0,025	UD	0,009	UD	0,009	UD	0,032	UD	0,040	UD
A394	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,202	G	0,019	UD	0,025	Z	0,056	Z	0,142	O	0,001	UD	0,035	UD	0,041	UD
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,034	UD	0,770	G	0,015	UD	0,718	G	0,271	G	0,563	G	0,183	O	0,797	G
A404	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,020	UD	0,069	O	0,017	UD	0,090	O	0,015	UD	0,089	Z	0,109	Z	0,277	G
A412b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,019	UD	0,022	UD	0,022	UD	0,042	UD	0,104	O	0,093	Z	0,010	UD	0,009	UD
A413	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,119	O	0,407	G	0,077	Z	0,099	O	0,163	G	0,147	O	0,153	O	0,475	G
C226	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,023	UD	0,162	G	0,017	UD	0,230	G	0,000	UD	0,123	Z	0,149	O	0,434	G
D504	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,094	Z	0,346	O	0,068	Z	0,287	G	0,130	G	0,110	Z	0,125	Z	0,409	G
D621	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,028	UD	0,185	O	0,050	Z	0,293	G	0,009	UD	0,095	Z	0,123	Z	0,475	G
D623	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,040	Z	0,091	O	0,189	O	0,568	G	0,231	G	0,443	G	0,099	Z	0,369	G
D494	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,337	G	0,036	UD	0,088	Z	0,020	UD	0,111	Z	0,767	G	0,211	O	0,178	G
DSM 15730 [†]	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,037	Z	0,022	UD	0,050	UD	0,027	Z	0,151	O	0,483	G	0,029	UD	0,157	G
DSM 25520 [†]	<i>A. calidus</i>	0,020	UD	0,000	UD	0,026	UD	0,004	UD	0,009	UD	0,112	Z	0,006	UD	0,243	G
A351a	<i>A. flavithermus</i>	0,020	UD	0,006	UD	0,007	UD	0,042	UD	0,068	O	0,099	Z	0,061	UD	0,018	UD
A352b	<i>A. flavithermus</i>	0,040	UD	0,033	UD	0,034	UD	0,070	Z	0,019	UD	0,143	O	0,043	UD	0,027	UD
A371	<i>A. flavithermus</i>	0,073	Z	0,023	Z	0,021	Z	0,039	Z	0,028	UD	0,008	UD	0,031	UD	0,033	UD
D486	<i>A. flavithermus</i>	0,002	UD	0,002	UD	0,061	Z	0,020	UD	0,039	UD	0,027	UD	0,021	UD	0,022	Z
DSM 2641 [†]	<i>A. flavithermus</i>	0,531	G	0,017	UD	0,032	UD	0,044	UD	0,229	G	0,103	Z	0,023	UD	0,147	Z

Çizelge 4.1 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS																	
Laboratuvar Kodu	İzolat/Referans Adı	48 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri	
DSM2641 ¹	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>flavithermus</i>	0,150	O	0,030	UD	0,044	UD	0,013	UD	0,206	G	0,019	UD	0,020	UD	0,031	O
D401a	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermanum</i>	0,050	UD	0,155	UD	0,046	Z	0,169	G	0,024	UD	0,139	O	0,023	UD	0,102	O
D404	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermanum</i>	0,023	UD	0,022	UD	0,010	UD	0,046	Z	0,024	Z	0,105	Z	0,018	UD	0,006	UD
D463	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermanum</i>	0,004	UD	0,012	UD	0,056	Z	0,001	UD	0,029	UD	0,019	UD	0,003	UD	0,023	Z
DSM 23293 ¹	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i>	0,422	G	2,964	G	0,288	G	2,261	G	0,461	G	3,537	G	1,119	G	3,630	G
NCIB 13933 ¹	<i>A. gonensis</i>	0,049	UD	0,770	G	0,023	UD	0,362	O	0,018	UD	0,104	Z	0,016	UD	0,806	G
D433a	<i>A. kamchatkensis</i>	0,033	UD	0,026	UD	0,041	UD	0,081	Z	0,106	O	0,147	O	0,025	UD	0,040	Z
DSM 14988 ¹	<i>A. kamchatkensis</i>	0,025	UD	0,085	Z	0,014	UD	0,310	G	0,109	G	2,374	G	0,255	G	1,099	G
DSM 21706 ¹	<i>A. kaynaricensis</i>	0,004	UD	0,013	UD	0,039	UD	0,010	UD	0,026	UD	0,020	UD	0,009	UD	0,010	UD
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,027	UD	0,018	UD	0,004	UD	2,485	G	0,018	UD	0,092	Z	0,007	UD	0,036	UD
D376b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,010	UD	0,007	UD	0,005	UD	0,023	UD	0,100	O	0,107	Z	0,000	UD	0,009	UD
E183	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,026	UD	0,040	UD	0,050	Z	0,114	O	0,031	UD	0,137	O	0,023	UD	0,033	UD
E184b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,037	UD	0,063	Z	0,018	UD	0,058	Z	0,047	Z	0,137	O	0,006	UD	0,073	O
E206b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,047	UD	0,139	Z	0,034	UD	0,160	O	0,012	UD	0,718	G	0,042	Z	0,566	G
E208b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,207	G	0,000	UD	0,037	UD	0,002	UD	0,285	G	0,005	UD	0,003	UD	0,000	UD
E272	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,006	UD	0,056	Z	0,040	UD	0,004	UD	0,035	UD	0,019	UD	0,001	UD	0,083	G
E331	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,020	UD	0,062	Z	0,067	Z	0,045	Z	0,024	UD	0,017	UD	0,008	UD	0,014	UD
D371a	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,025	UD	0,000	UD	0,011	UD	0,002	UD	0,010	UD	0,092	UD	0,023	UD	0,190	Z
D394	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,051	UD	0,005	UD	0,030	UD	0,006	UD	0,020	UD	0,112	Z	0,031	Z	0,129	Z

Çizelge 4.1 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

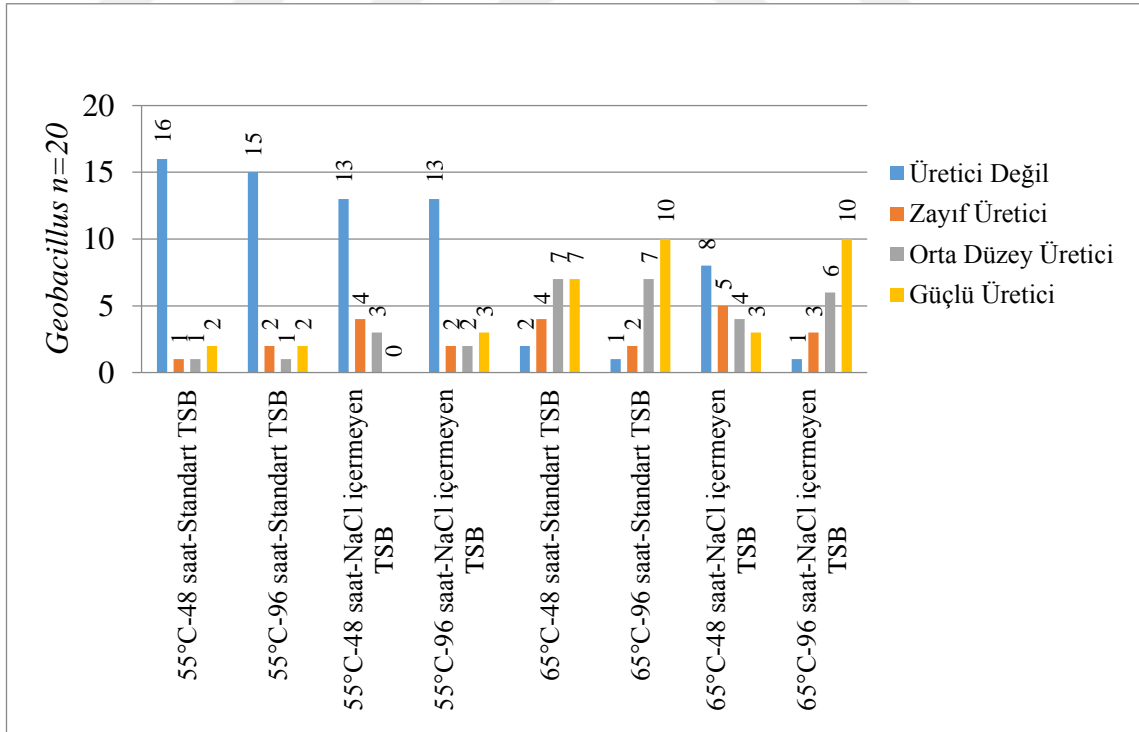
ANOXYBACILLUS																	
Laboratuvar Kodu	İzolat/Referans Adı	48 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri	
D455	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,015	UD	0,000	UD	0,011	UD	0,000	UD	0,011	UD	0,093	UD	0,017	UD	0,241	O
D594	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,017	UD	0,002	UD	0,020	UD	0,061	UD	0,151	G	0,137	Z	0,010	UD	0,382	O
E123	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,021	UD	0,000	UD	0,013	UD	0,003	UD	0,018	UD	0,082	UD	0,030	UD	0,224	Z
E237	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,004	UD	0,018	UD	0,036	UD	0,012	UD	0,194	O	0,032	UD	0,011	UD	0,009	UD
E243	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,015	UD	0,037	UD	0,031	UD	0,038	Z	0,041	UD	0,018	UD	0,000	UD	0,027	Z
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,033	UD	0,028	UD	0,026	UD	0,059	UD	0,009	UD	0,093	UD	0,022	UD	0,133	Z
DSM 18375 ^T	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,029	Z	0,075	UD	0,087	Z	0,061	O	0,042	UD	0,425	G	0,040	UD	0,253	G
NCIB 13971 ^T	<i>A. kestanbolensis</i>	0,034	UD	0,000	UD	0,022	UD	0,026	UD	0,211	G	0,521	G	0,047	Z	0,271	O
DSM 19169 ^T	<i>A. mongoliensis</i>	0,036	UD	0,074	Z	0,019	UD	0,159	O	0,024	Z	0,112	Z	0,042	Z	0,174	Z
DSM 17127 ^T	<i>A. rupiensis</i>	0,165	G	0,090	Z	0,071	Z	0,190	G	0,227	G	0,036	UD	0,016	UD	0,006	UD
DSM 22626 ^T	<i>A. salavatliensis</i>	0,022	UD	0,013	UD	0,000	UD	0,010	UD	0,012	UD	0,015	Z	0,015	UD	0,018	UD
A414	<i>A. salavatliensis</i>	0,055	Z	0,046	Z	0,056	Z	0,154	O	0,061	Z	0,169	O	0,040	UD	0,237	G
D232a	<i>A. salavatliensis</i>	0,021	UD	0,006	UD	0,016	UD	0,012	UD	0,140	G	0,256	G	0,092	Z	0,109	O
D242b	<i>A. salavatliensis</i>	0,120	O	0,081	O	0,077	O	0,069	O	0,277	G	0,152	G	0,111	O	0,096	Z
A402b	<i>A. salavatliensis</i>	0,001	UD	0,001	UD	0,017	UD	0,001	UD	0,017	UD	0,019	UD	0,005	UD	0,000	UD
C245	<i>A. salavatliensis</i>	0,034	UD	0,050	UD	0,023	UD	0,012	UD	0,016	UD	0,116	Z	0,022	UD	0,277	O
D36	<i>A. salavatliensis</i>	0,025	UD	0,015	UD	0,025	UD	0,009	UD	0,011	UD	0,254	O	0,021	UD	0,308	O
D392	<i>A. salavatliensis</i>	0,000	UD	0,002	UD	0,017	UD	0,020	UD	0,007	UD	0,012	UD	0,009	UD	0,000	UD
C163a	<i>A. salavatliensis</i>	0,012	UD	0,000	UD	0,011	UD	0,000	UD	0,003	UD	0,085	Z	0,000	UD	0,001	UD
D98a	<i>A. salavatliensis</i>	0,047	UD	0,031	UD	0,034	UD	0,109	O	0,036	Z	0,185	O	0,027	UD	0,066	Z
D202a	<i>A. salavatliensis</i>	0,029	UD	0,004	UD	0,003	UD	0,023	UD	0,029	UD	0,010	UD	0,005	UD	0,018	UD
D203b	<i>A. salavatliensis</i>	0,049	UD	0,090	O	0,037	UD	0,063	Z	0,561	G	0,568	G	0,292	G	0,617	G
D204	<i>A. salavatliensis</i>	0,036	UD	0,014	UD	0,005	UD	0,027	UD	0,430	G	0,221	G	0,069	Z	0,109	O
D205	<i>A. salavatliensis</i>	0,075	Z	0,062	O	0,072	O	0,077	O	0,871	G	0,486	G	0,077	Z	0,158	O

Çizelge 4.1 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

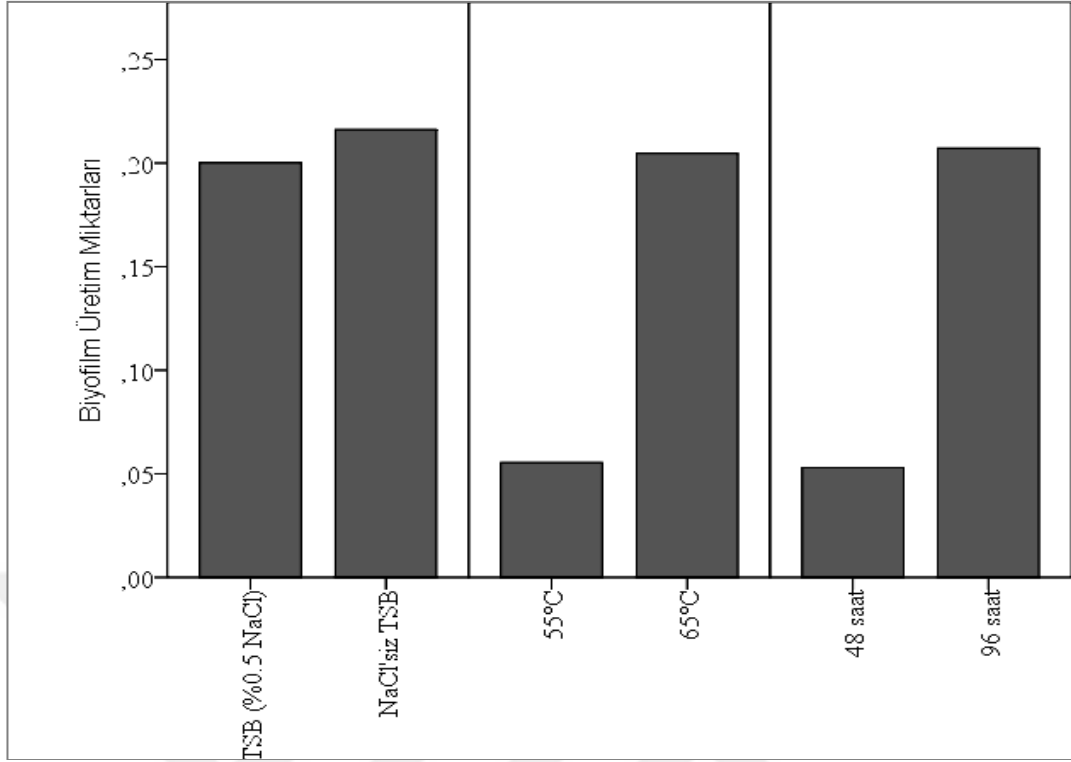
ANOXYBACILLUS																	
Laboratuvar Kodu	İzolat/Referans Adı	48 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-55°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içeren TSB besiyeri		48 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri		96 saat-65°C- NaCl içermeyen TSB besiyeri	
D211	<i>A. salavatliensis</i>	0,013	UD	0,044	Z	0,019	UD	0,009	UD	0,003	UD	0,105	Z	0,008	UD	0,013	UD
D213	<i>A. salavatliensis</i>	0,051	Z	0,019	UD	0,012	UD	0,035	Z	0,008	UD	0,004	UD	0,075	Z	0,061	Z
D214	<i>A. salavatliensis</i>	0,034	UD	0,142	G	0,025	UD	0,070	Z	0,030	UD	0,102	Z	0,010	Z	0,064	Z
D221a	<i>A. salavatliensis</i>	0,016	UD	0,000	UD	0,004	UD	0,000	UD	0,008	UD	0,120	Z	0,008	UD	0,110	UD
D243	<i>A. salavatliensis</i>	0,106	Z	0,000	UD	0,000	UD	0,043	Z	0,292	G	0,111	Z	0,000	UD	0,000	UD
D487	<i>A. salavatliensis</i>	0,036	Z	0,075	Z	0,113	O	0,082	O	0,058	UD	0,046	UD	0,055	Z	0,070	G
D503	<i>A. salavatliensis</i>	0,090	Z	0,042	Z	0,056	Z	0,083	Z	0,048	Z	0,173	O	0,033	UD	0,148	G
E206a	<i>A. salavatliensis</i>	0,054	Z	2,511	G	0,023	UD	0,259	O	0,055	O	0,125	Z	0,020	UD	0,235	O
D591	<i>A. salavatliensis</i>	0,017	UD	0,026	UD	0,073	Z	0,044	Z	0,245	G	0,617	G	0,196	O	0,247	G
DSM 27374 ¹	<i>A. suryakondensis</i>	0,032	UD	0,028	UD	0,023	UD	0,006	UD	0,014	UD	0,097	UD	0,019	UD	0,112	UD
DSM 16325 ¹	<i>A. tepidamans</i>	0,592	G	0,833	G	0,474	G	0,633	G	0,089	G	0,341	O	0,098	O	0,496	G
DSM 17141 ¹	<i>A. thermarum</i>	0,087	G	0,138	O	0,054	UD	0,118	G	0,258	G	0,100	Z	0,059	Z	0,117	G
DSM 17075 ¹	<i>A. voinovskiensis</i>	0,078	Z	0,266	O	0,120	O	0,292	O	0,084	O	0,774	G	0,072	O	1,563	G

*ÜD; Üretici değil, Z; Zayıf üretici, O; Orta düzey, G; Güçlü üretici

Tüm bakterilerin biyofilm üretim kapasitelerinin belirlenmesi, iki kritik inkübasyon sıcaklığı (55 °C ve 65 °C), iki farklı tuz içeriğine sahip TSB besiyeri (standart ve NaCl içermeyen) ve iki farklı inkübasyon süresi (48 saat ve 96 saat) esas alınarak gerçekleştirilmiştir. *Geobacillus* cinsine ilişkin sonuçlar dikkate alındığında, uzun süreli inkübasyon süresinin (96 saat) ve 65 °C inkübasyon sıcaklığının biyofilm üretimini teşvik edecek mahiyette olduğu saptanmıştır. Bu cins dahil bakterilerin genel biyofilm üretim karakteristikleri sınır değerleri (cut off) göz önünde bulundurulduğunda; ozmolaritenin biyofilm üretimindeki etkisinin tür düzeyinde belirleyici olduğu ancak; cins düzeyindeki genel biyofilm üretim eğilimi üzerinde belirleyici olmadığı görülmektedir. (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu cins dahilinde güçlü biyofilm üreticisi karakteristiklere yalnızca 65 °C inkübasyon sıcaklığında rastlanmıştır. Bu cins dahil üyeler arasında en yüksek düzeyde biyofilm üretim potansiyeli, *G. kaustophilus* DSM 7263^T ve *G. toebii* DSM 14590^T referanslarında rastlanmıştır (65 °C’de, OD: 2,964 ve OD: 3,911 sırasıyla). *G. stearothermophilus* DSM 22^T referans suşunda ise hiçbir inkübasyon koşulunda biyofilm üretimi saptanmamıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 *Geobacillus* cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim karakteristikleri



Şekil 4.2 *Geobacillus* cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim miktarlarının histogramları

Şekil 4.2’de de görüldüğü üzere *Geobacillus* cinsinde biyofilm üretimini artıran temel koşullar, uzun inkübasyon süresi ve yüksek sıcaklıktır. Biyofilm üretim miktarının maksimum olduğu bu iki koşulda besiyeri ozmolaritesinin, genel biyofilm üretim profili ele alındığında, belirleyici olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Tukey Testi, $p=0,308$, $p<0,05$). Çevresel faktörlerin (besiyeri tipi, sıcaklık, inkübasyon süresi) biyofilm üretim miktarı (bağımlı değişken) üzerindeki etkilerini tek tek ve kombine bir şekilde değerlendirmek adına “Univariate” analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Çoklu çevresel değişkenlerin *Geobacillus* cinsine üye bakterilerin biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

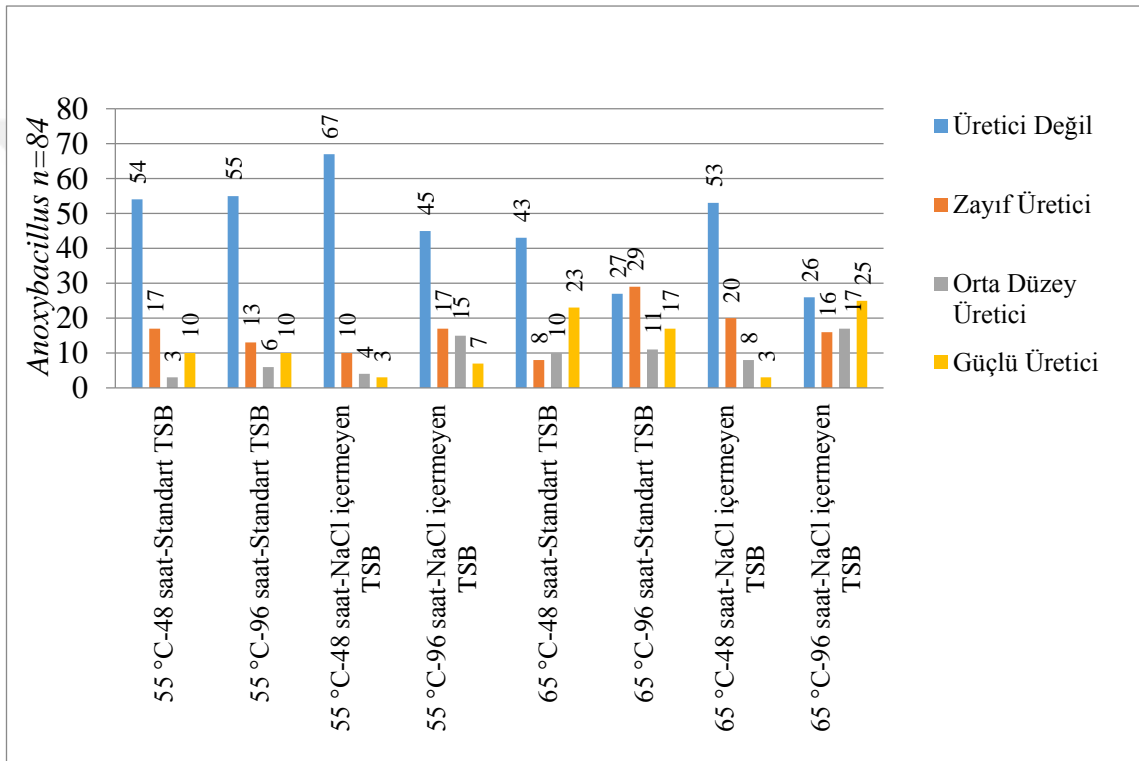
Bağımlı değişkenler	F	Sig. (p)
Model	4,173	,000
Intercept	33,679	,000
Besiyeri ozmolaritesi	,050	,823
İnkübasyon sıcaklığı	11,068	,001 *
İnkübasyon süresi	11,851	,001 *
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon sıcaklığı	,049	,825
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon süresi	,494	,483
İnkübasyon sıcaklığı-İnkübasyon süresi	5,206	,024 *
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon sıcaklığı-İnkübasyon süresi	,490	,485

*Univariate analizi;“p” değerleri bağımlı değişkenler arasındaki ilişkinin anlamlı olduğuna işaret etmektedir (p<0,05).

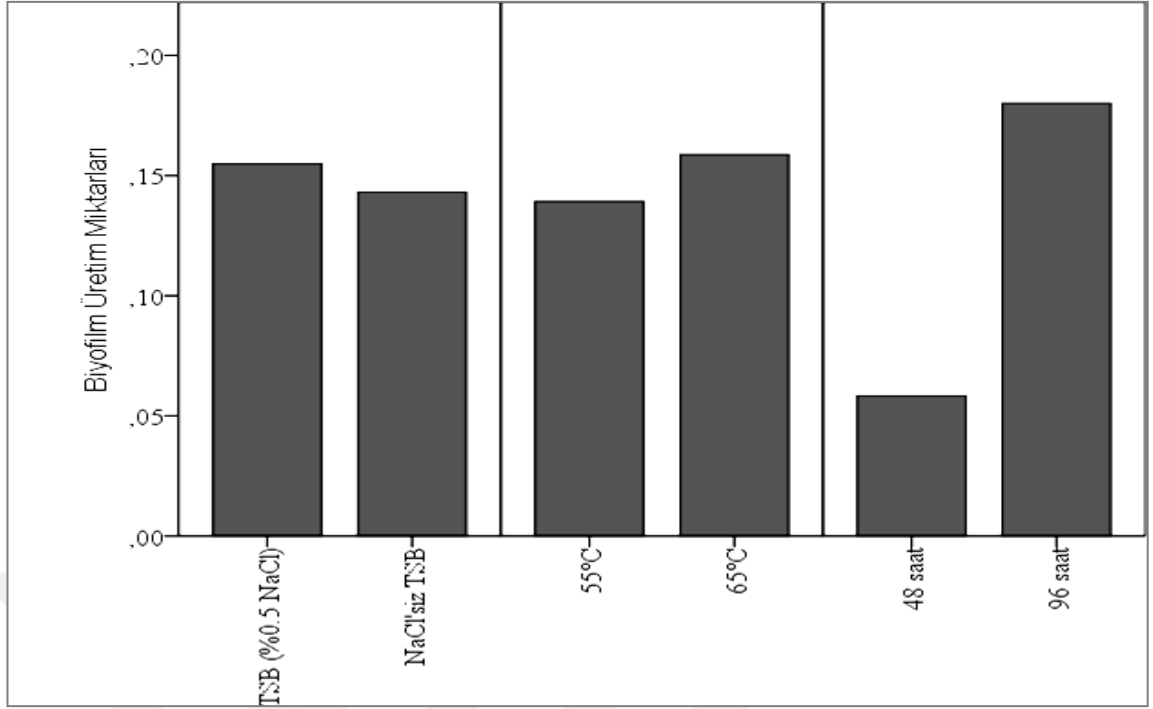
Geobacillus cinsine dahil üyelerin biyofilm üretim kapasiteleri üzerine çevresel faktörlerin kombine etkileri değerlendirildiğinde, yine yüksek inkübasyon sıcaklığının (65 °C) ve uzun inkübasyon süresinin (96 saat) biyofilm üretimini teşvik edici mahiyette olduğu görülmektedir. Bu iki faktör, besiyeri tipinden bağımsız olarak bu cinsin üyelerinin biyofilm üretimleri üzerinde belirleyicidir (Çizelge 4.2).

Anoxybacillus cinsine dahil üyelerin ilgili çalışma dahilinde genel olarak biyofilm üretim karakteristiklerine bakıldığında ise inkübasyon sıcaklığının ve besiyeri ozmolaritesinin belirleyici olmadığı görülmektedir. Bu gruba dahil bakterilerin biyofilm üretimlerindeki artışta asıl belirleyici çevresel faktörün uzun inkübasyon periyodu (96 saat) olduğu saptanmıştır. Yine besiyeri ozmolaritesi dikkate alındığında; biyofilm üretimi için tuz ihtiyacının tür düzeyinde farklılık gösterdiği gözlenirken, cins düzeyinde genel üretim profiline bakıldığında bu faktörün belirleyici olmadığı görülmektedir (Tukey Test, p=1,0, p <0,05). Artan inkübasyon sıcaklığının (65 °C) bu cinsin üyelerinde biyofilm üretim kapasitesi itibariyle “güçlü” karakteristik sergileme yönünde bir etkisi olsa da, cinsin tüm üyeleri ele alındığında iki inkübasyon sıcaklığı

arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.3 - 4.4). *Anoxybacillus* cinsinde en yüksek düzeyde biyofilm üreticisi olarak saptanan üyeler, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* DSM 23293^T (65 °C’de OD: 3,630) ve *A. ayderensis* NCIB 13972^T (55 °C’de OD: 4,000) referans suşlarıdır. *A. kaynarcensis* DSM 21706^T, *A. suryakundensis* DSM 27374^T referans suşlarında ve *A. salavatliensis* A402b, *A. salavatliensis* D392, *A. salavatliensis* 202a izolatlarında ise hiçbir inkübasyon koşulunda biyofilm üretimi saptanmamıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.3 *Anoxybacillus* cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim karakteristikleri



Şekil 4.4 *Anoxybacillus* cinsine dahil izolat ve referansların tanımlı koşullar dahilindeki biyofilm üretim miktarlarının histogramları

Anoxybacillus cinsine dahil üyelerin biyofilm üretim kapasiteleri üzerine kombine çevresel faktörlerin etkileri değerlendirildiğinde (Univariate analizi), uzun inkübasyon süresinin (96 saat) biyofilm üretimini teşvik edici mahiyette tek faktör olduğu görülmektedir. Bu faktör, besiyeri tipinden ve inkübasyon sıcaklığından bağımsız olarak bu cinsin üyelerinin biyofilm üretimleri üzerinde belirleyicidir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Çoklu çevresel değişkenlerin *Anoxybacillus* cinsine üye bakterilerin biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

Bağımlı değişkenler	F	Sig. (p)
Model	3,758	,001
Intercept	96,039	,000
Besiyeri ozmolaritesi	,150	,699
İnkübasyon sıcaklığı	,410	,522
İnkübasyon süresi	25,069	,000*
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon sıcaklığı	,086	,769
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon süresi	,515	,473
İnkübasyon sıcaklığı-İnkübasyon süresi	,059	,808
Besiyeri ozmolaritesi-İnkübasyon sıcaklığı - İnkübasyon süresi	,017	,896

*Univariate analizi; “p” değerleri bağımlı değişkenler arasındaki ilişkinin anlamlı olduğuna işaret etmektedir (p<0,05).

4.2 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* Cinslerine Üye İzolatların ve Referans Suşların Standart Tam Yağlı Süt Ortamında Biyofilm Üretim Miktarlarının Polistiren Mikrotitre Plakalarda Belirlenmesi

Çalışma dahilinde sütteki proteinlerin yüksek adhezif özelliklerinden ötürü negatif kontrol kuyularından (yalnızca standart tam yağlı süt içeren kuyular) elde edilen sınır değerleri, TSB besiyerinden elde edilen sınır değerlerine göre yüksek çıkmaktadır. Bu nedenle, süt içeriğindeki “whey” proteinlerinin yüksek inkübasyon sıcaklıklarında belli zaman sonra koagüle olmasından ötürü inkübasyon süresi bu çalışmada bir önceki çalışmadakinden farklı olarak 48 saat ile sınırlandırılmıştır. Çalışma yine iki kritik inkübasyon sıcaklığında yürütülmüştür (55-65 °C). Çalışmaya dahil edilen tüm *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsleri üyelerinin polistiren mikrotitre plakalardaki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri

GEOBACILLUS					
İzolat ve Referans Kodları	İzolat/Referans Adı	48 saat-55 °C-STYS		48 saat-65 °C-STYS	
A353	<i>Geobacillus sp.</i>	0,289	Z	1,087	O
C304	<i>Geobacillus sp.</i>	0,190	UD	0,811	O
D413	<i>Geobacillus sp.</i>	0,278	Z	0,780	Z
E173b	<i>Geobacillus sp.</i>	0,266	Z	0,295	UD
DSM 7263 ^T	<i>G. kaustophilus</i>	0,159	UD	0,441	Z
A113	<i>G. stearothermophilus</i>	0,249	UD	0,529	Z
DSM 22 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>	0,152	UD	0,183	UD
ATCC 43223 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>	0,169	UD	0,552	Z
DSM 5934 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>	0,129	UD	0,323	UD
DSM 22625 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,328	Z	0,369	UD
DSM 465 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,160	UD	0,327	O
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,195	UD	1,490	O
DSM 22628 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	0,239	UD	0,316	UD
DSM 22629 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	0,216	UD	0,395	UD
DSM 2542 ^T	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,225	UD	0,829	O
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,236	UD	1,126	O
DSM 5366 ^T	<i>G. thermoleovorans</i>	0,149	UD	0,326	UD
E134	<i>G. toebii</i>	0,243	UD	0,244	UD
DSM 14590 ^T	<i>G. toebii</i>	0,143	UD	1,536	O
DSM 13174 ^T	<i>G. vulcanii</i>	0,277	Z	0,622	Z

Çizelge 4.4 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS					
İzolot ve Referans Kodları	İzolot/Referans Adı	48 saat-55 °C-STYS		48 saat-65 °C-STYS	
A3210	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,158	Z	0,616	G
A321	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,187	O	0,466	Z
E184aa	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,180	Z	0,343	O
E184ab	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,098	UD	0,487	O
E208a	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,233	G	0,284	Z
DSM 15939 ^T	<i>A. amylolyticus</i>	0,150	O	0,198	UD
NCIB 13972 ^T	<i>A. ayderensis</i>	0,283	G	0,893	O
A142	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,474	G	0,403	O
A146	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,124	Z	0,675	G
A335	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,161	Z	0,652	G
A392b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,251	O	0,950	G
A394	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,711	G	0,530	G
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,203	O	2,119	G
A404	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,103	UD	0,977	G
A412b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,228	O	0,175	Z
A413	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,120	Z	0,359	O
C226	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,108	Z	0,480	G
D504	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,076	UD	0,406	O
D621	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,152	Z	0,375	O
D623	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,140	Z	0,222	Z
D494	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,115	O	1,213	G
DSM 15730 ^T	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,433	O	1,023	G
DSM 25520 ^T	<i>A. calidus</i>	0,143	Z	0,422	O
A351a	<i>A. flavithermus</i>	1,044	G	0,581	G
A352b	<i>A. flavithermus</i>	0,468	G	0,166	Z
A371	<i>A. flavithermus</i>	0,196	O	0,325	O
D486	<i>A. flavithermus</i>	0,113	Z	0,211	Z
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i>	0,232	G	0,428	Z
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>flavithermus</i>	0,454	G	0,624	G
D401a	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	0,164	Z	0,194	Z
D404	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	0,155	Z	0,485	G
D463	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	0,202	O	0,359	O
DSM 23293 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i>	1,407	G	0,901	G
NCIB 13933 ^T	<i>A. gonensis</i>	0,138	O	0,285	Z
D433a	<i>A. kamchatkensis</i>	0,140	Z	0,223	Z
DSM 14988 ^T	<i>A. kamchatkensis</i>	0,138	O	0,144	UD

Çizelge 4.4 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS					
İzolat ve Referans Kodları	İzolat/Referans Adı	48 saat-55 °C-STYS		48 saat-65 °C-STYS	
DSM 21706 ^T	<i>A. kaynarcensis</i>	0,729	G	0,249	O
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,180	O	1,927	G
D222b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,409	G	0,727	G
D376b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,375	G	0,680	G
E183	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,123	Z	0,382	O
E184b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,205	O	1,163	G
E206b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,320	G	1,165	G
E208b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,421	G	1,691	G
E272	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,217	G	0,322	Z
E331	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,229	G	0,684	O
D371a	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,127	O	0,475	Z
D394	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,113	O	1,680	G
D455	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,170	O	1,017	G
D594	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	1,857	G	1,685	G
E123	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	1,540	G	1,482	G
E237	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	1,565	G	0,887	G
E243	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,273	O	0,775	G
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,178	O	0,586	O
DSM 18375 ^T	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,992	G	0,275	O
NCIB 13971 ^T	<i>A. kestanbolensis</i>	0,160	O	0,154	UD
DSM 19169 ^T	<i>A. mongoliensis</i>	0,696	G	0,486	G
DSM 17127 ^T	<i>A. rupiensis</i>	0,136	Z	0,289	O

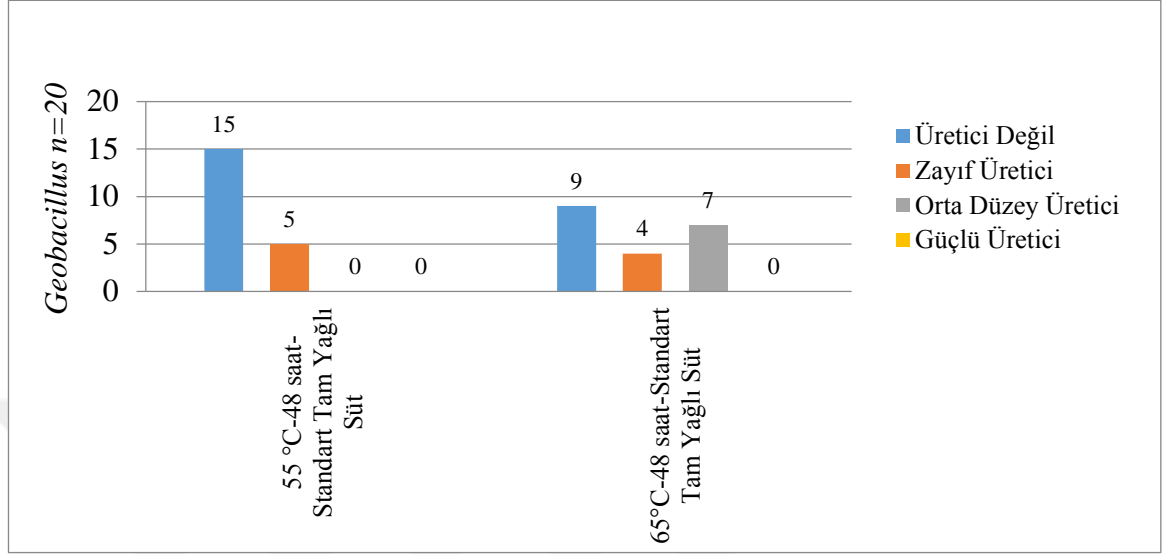
Çizelge 4.4 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim miktarları ve karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS					
İzolat ve Referans Kodları	İzolat/Referans Adı	48 saat-55 °C-STYS		48 saat-65 °C-STYS	
DSM 22626 ^T	<i>A. salavatliensis</i>	0,156	Z	0,436	G
A414	<i>A. salavatliensis</i>	0,139	Z	0,422	O
D232a	<i>A. salavatliensis</i>	0,221	O	0,279	O
D242b	<i>A. salavatliensis</i>	0,375	G	0,504	G
A402b	<i>A. salavatliensis</i>	0,211	O	0,437	Z
C245	<i>A. salavatliensis</i>	0,142	O	0,236	UD
D36	<i>A. salavatliensis</i>	0,132	O	0,257	Z
D392	<i>A. salavatliensis</i>	0,124	O	0,386	Z
C163a	<i>A. salavatliensis</i>	0,136	Z	0,341	O
D98a	<i>A. salavatliensis</i>	0,108	Z	0,403	O
D202a	<i>A. salavatliensis</i>	0,163	Z	1,058	G
D203b	<i>A. salavatliensis</i>	0,100	Z	0,721	G
D204	<i>A. salavatliensis</i>	0,147	Z	1,029	G
D205	<i>A. salavatliensis</i>	0,154	Z	0,531	G
D211	<i>A. salavatliensis</i>	0,139	Z	0,459	G
D213	<i>A. salavatliensis</i>	0,176	O	1,539	G
D214	<i>A. salavatliensis</i>	0,170	O	2,441	G
D221a	<i>A. salavatliensis</i>	0,158	Z	2,036	G
D243	<i>A. salavatliensis</i>	0,184	O	0,159	Z
D487	<i>A. salavatliensis</i>	0,241	O	0,291	O
D503	<i>A. salavatliensis</i>	0,119	Z	0,208	Z
E206a	<i>A. salavatliensis</i>	0,224	G	0,956	O
D591	<i>A. salavatliensis</i>	3,096	G	0,716	G
DSM 27374 ^T	<i>A. suryakundensis</i>	2,619	G	0,611	G
DSM 16325 ^T	<i>A. tepidemans</i>	0,550	G	0,355	O
DSM 17141 ^T	<i>A. thermarum</i>	1,134	G	0,529	G
DSM 17075 ^T	<i>A. voinovskiensis</i>	1,278	G	0,661	G

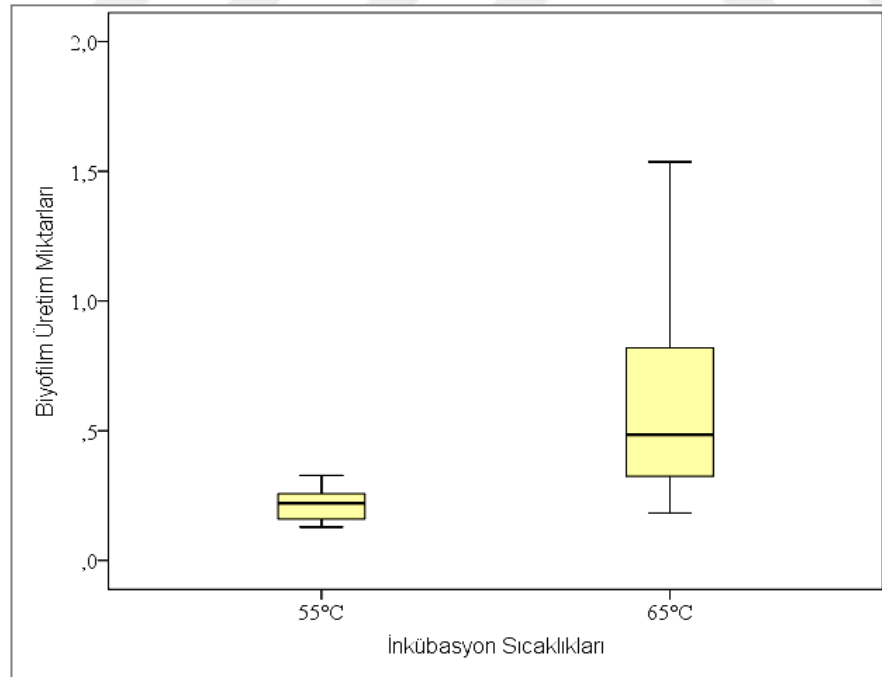
UD; Üretici değil, Z; Zayıf üretici, O; Orta düzey, G; Güçlü üretici, STYS; Standart Tam Yağlı Süt

Bir önceki çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak, bu çalışmada da *Geobacillus* cinsine dahil üyelerde yüksek inkübasyon sıcaklığının (65 °C) biyofilm üretimini teşvik edecek mahiyette olduğu saptanmıştır (Karşılaştırmalı T testi, p<0,05), (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Ancak TSB içerikli besiyerlerine nispeten güçlü biyofilm üreticisi bakterilere rastlanmamıştır. *G. stearothermophilus* DSM 22^T, *G. stearothermophilus* DSM 5934^T, *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* DSM 22628^T, *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* DSM 22629^T, *G. thermoleovorans* DSM 5366^T referans suşlarında ve *G. toebii*

E134 izolatında polistiren yüzeylerde, standart tam yağlı süt içeriğinde biyofilm üretimi saptanmamıştır (Çizelge 4.4).

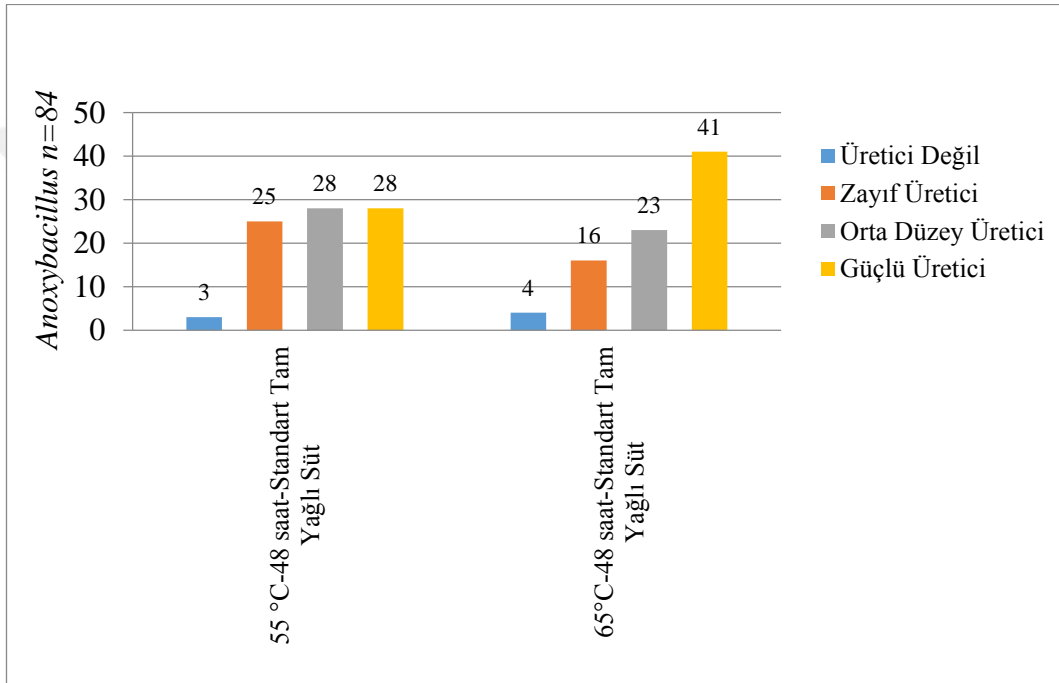


Şekil 4.5 *Geobacillus* cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim karakteristikleri

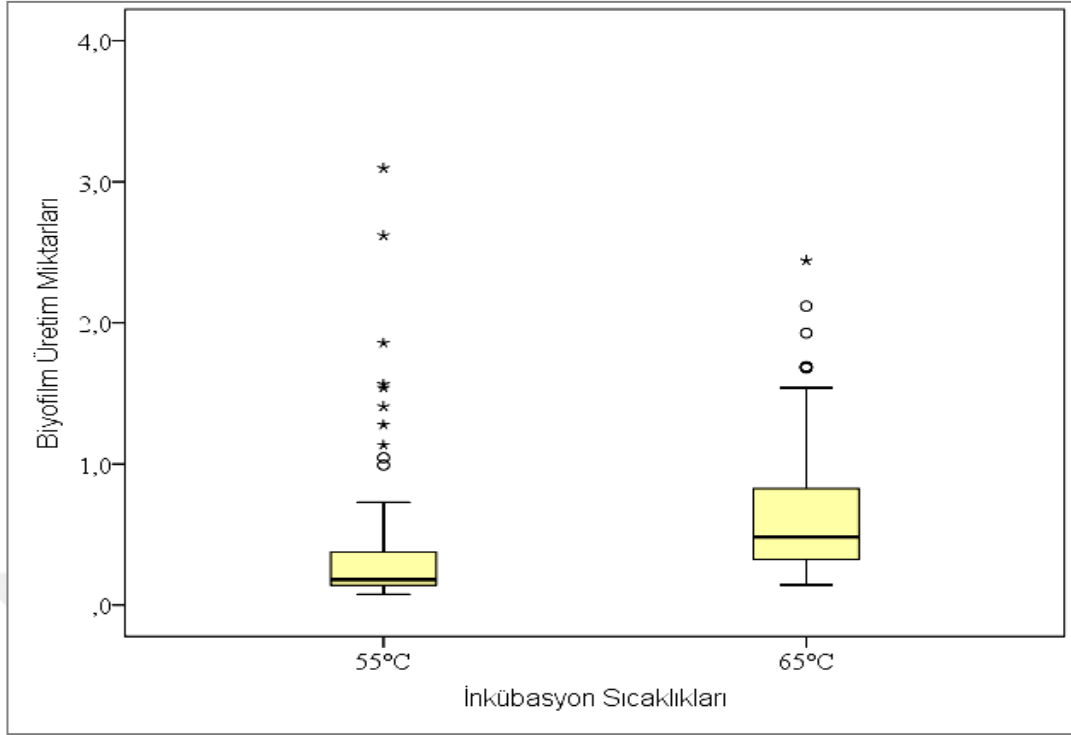


Şekil 4.6 *Geobacillus* cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki ve iki farklı sıcaklıktaki biyofilm üretim miktarlarının karşılaştırması

Anoxybacillus cinsine dahil üyelerde de yine benzer şekilde 65 °C’de biyofilm üretim miktarı artmaktadır (Karşılaştırmalı T testi, $p < 0,05$), (Şekil 4.7, 4.8). Bu grupta yüksek inkübasyon sıcaklığında TSB besiyerine nispeten çok daha fazla sayıda güçlü biyofilm üreticisi bakteriye rastlanmıştır. Özellikle *A. caldiproteolyticus*, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* ve *A. salavatliensis* türlerine üye izolat ve referans suşların polistiren yüzeylerde 65 °C’de “güçlü” biyofilm üretim karakteristiği göstermeleri dikkat çekmektedir.



Şekil 4.7 *Anoxybacillus* cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim karakteristikleri



Şekil 4.8 *Anoxybacillus* cinsine dahil izolat ve referansların standart tam yağlı süt içerisinde ve iki farklı sıcaklıktaki biyofilm üretim miktarlarının karşılaştırması

4.3 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Cinslerine Dahil Üyelerin Laktozu Fermente ve Kazeini Hidrolize Edebilme Niteliklerinin Belirlenmesi

Geobacillus ve *Anoxybacillus* cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme sonuçları çizelge 4.5'te verilmiştir. Söz konusu biyokimyasal testler, termofilik basillerin süt içerisindeki kazein ve laktoz gibi major komponentlerin varlığında sahip oldukları fenotipik karakteristiklerin etkilerine bağlı olarak biyofilm üretim kapasitelerinin nasıl değişebileceği hususunda yorum yapabilmek adına gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme özelliklerinin belirlenmesi

<i>GEOBACILLUS</i>		Laktöz fermentasyonu				Kazein Hidrolizi	
Referans ve İzolat Kodları	İzolat/Referans adı	Laktöz Fermentasyonu	Üreme	Gaz Oluşumu	pH	Kazein Hidrolizi	Üreme
A353	<i>Geobacillus sp.</i>	+	İyi	Yok	Asidik	+	İyi
C304	<i>Geobacillus sp.</i>	-	Yok	Yok	—	+	Çok iyi
D413	<i>Geobacillus sp.</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
E317b	<i>Geobacillus sp.</i>	++	Çok iyi	Yok	Asidik	++	Çok iyi
DSM 7263 ^T	<i>G. kaustophilus</i>	-	İyi	Yok	Bazik	++	İyi
A113	<i>G. stearothermophilus</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	İyi
DSM 22 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	-	-
ATCC 43223	<i>G. stearothermophilus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	+	İyi
DSM 5934 ^T	<i>G. stearothermophilus</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	+	Çok iyi
DSM 22625 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	İyi
DSM 465 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>	-	Yok	Yok	—	-	Çok iyi
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	++	Çok iyi
DSM 22628 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	+	Çok iyi
DSM 22629 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	+	İyi
DSM 2542 ^T	<i>G. thermoglucosidans</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	İyi
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+	Zayıf
DSM 5366 ^T	<i>G. thermoleovorans</i>	-	İyi	Yok	Bazik	++	İyi
E134	<i>G. toebii</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Çok iyi
DSM 14590 ^T	<i>G. toebii</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Çok iyi
DSM 13174 ^T	<i>G. vulcanii</i>	+	İyi	Yok	Asidik	++	İyi

Çizelge 4.5 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme özelliklerinin belirlenmesi (devam)

ANOXYBACILLUS		Laktöz fermentasyonu				Kazein Hidrolizi	
Referans ve İzolat Kodları	İzolat/Referans adı	Laktöz Fermentasyonu	Üreme	Gaz Oluşumu	pH	Kazein Hidrolizi	Üreme
A321	<i>Anoxybacillus</i> sp.	-	İyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
A3210	<i>Anoxybacillus</i> sp.	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
E184aa	<i>Anoxybacillus</i> sp.	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
E184ab	<i>Anoxybacillus</i> sp.	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
E208a	<i>Anoxybacillus</i> sp.	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
DSM 15939 ^T	<i>A. amylolyticus</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	İyi
NCIB 13972 ^T	<i>A. ayderensis</i>	+	İyi	Yok	Asidik	+++	Çok iyi
A142	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
A146	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
A335	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
A392b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
A394	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>	++	İyi (halka formu)	Yok	Asidik	++	İyi
A404	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
A412b	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
A413	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
C226	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
D504	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
D621	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
D623	<i>A. caldiproteolyticus</i>	++	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
D494	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	+	Çok iyi
DSM 15730 ^T	<i>A. caldiproteolyticus</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+	Çok iyi
DSM 25520 ^T	<i>A. calidus</i>	-	Zayıf (halka formu)	Yok	Bazik	++	İyi
A351a	<i>A. flavithermus</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	++	İyi
A352b	<i>A. flavithermus</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	++	Çok İyi
A371	<i>A. flavithermus</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	İyi
D486	<i>A. flavithermus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	-	—

Çizelge 4.5 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme özelliklerinin belirlenmesi (devam)

ANOXYBACILLUS		Laktöz fermentasyonu				Kazein Hidrolizi	
Referans ve İzolat Kodları	İzolat/Referans adı	Laktöz Fermentasyonu	Üreme	Gaz Oluşumu	pH	Kazein Hidrolizi	Üreme
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>flavithermus</i>	+	Zayıf	Yok	Asidik	-	—
D463	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	-	Zayıf (halka formu)	Yok	Bazik	+	İyi
D401a	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	-	Zayıf (halka formu)	Yok	Bazik	+	Zayıf
D404	<i>A. flavithermus</i> - <i>A. thermarum</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
DSM 23293 ^T	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
NCIB 13933	<i>A. gonensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	İyi
D433a	<i>A. kamchatkensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Çok iyi
DSM 14988 ^T	<i>A. kamchatkensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
DSM 21706 ^T	<i>A. kaynarcensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
D222b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Yok	Yok	—	-	—
D376b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	Zayıf
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
D371a	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi	Yok	Asidik	-	—
D394	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
D455	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Yok	Yok	—	-	—
D594	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
E123	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
E183	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	—
E184b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	Yok	Yok	—	-	Zayıf
E206b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
E208b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
E237	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	İyi
E243	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
E272	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	+++	İyi	Yok	Asidik	-	Zayıf

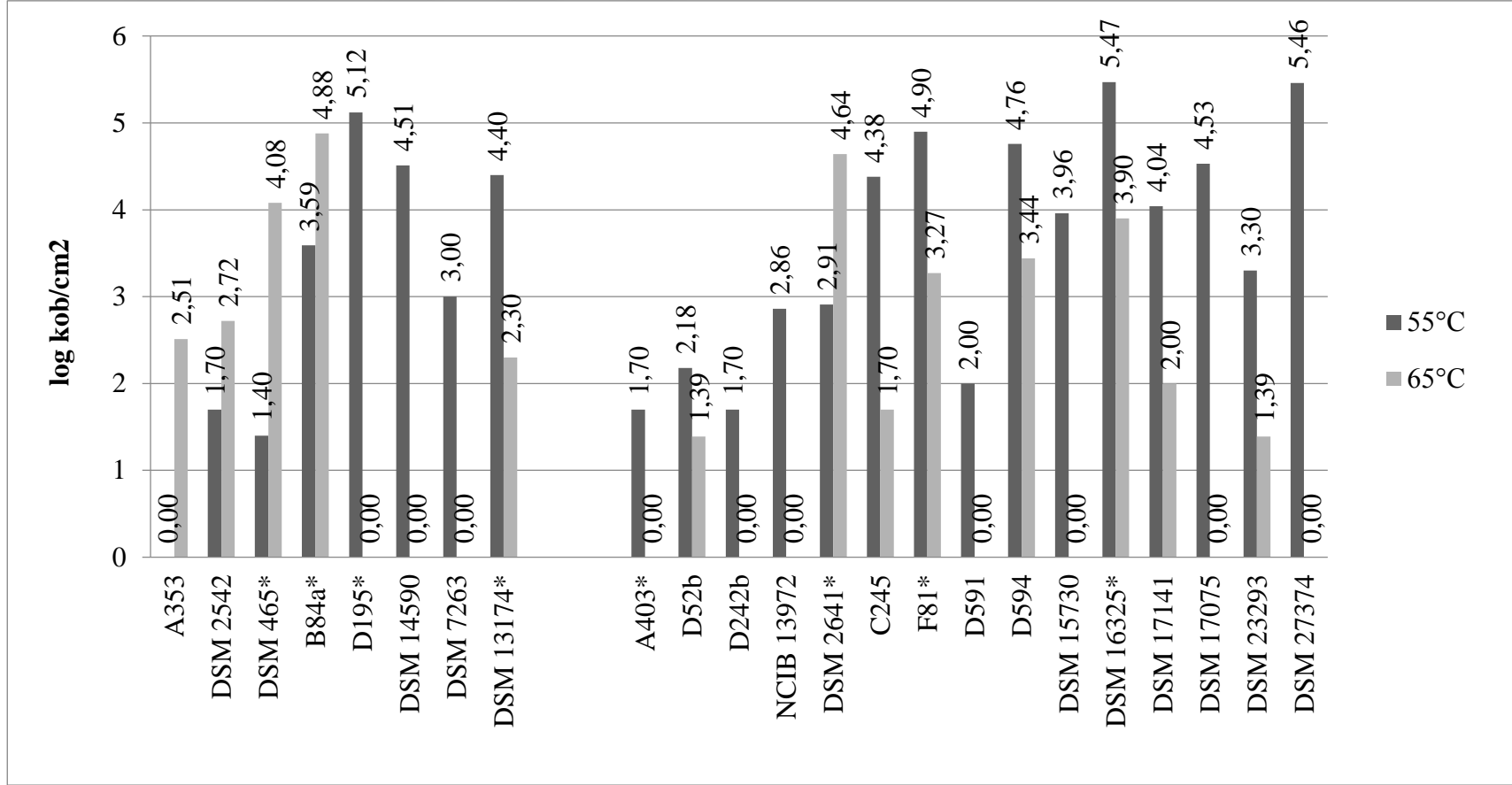
Çizelge 4.5 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye bakterilerin laktozu fermente ve kazeini hidrolize edebilme özelliklerinin belirlenmesi (devam)

ANOXYBACILLUS		Laktoz fermentasyonu				Kazein Hidrolizi	
Referans ve İzolat Kodları	İzolat/Referans adı	Laktoz Fermentasyonu	Üreme	Gaz Oluşumu	pH	Kazein Hidrolizi	Üreme
E331	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	İyi
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	+	İyi	Yok	Asidik	-	Çok iyi
DSM 18475 ^T	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
NCIB 13971 ^T	<i>A. kestanbolensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
DSM 19169 ^T	<i>A. mongoliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
DSM 17127 ^T	<i>A. rupiensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Zayıf
DSM 22626 ^T	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
A402b	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
A414	<i>A. salavatliensis</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	—
C163a	<i>A. salavatliensis</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	++	İyi
C245	<i>A. salavatliensis</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	—
D36	<i>A. salavatliensis</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	—
D98a	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
D202a	<i>A. salavatliensis</i>	-	Zayıf (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
D203b	<i>A. salavatliensis</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	Çok iyi
D204	<i>A. salavatliensis</i>	+	İyi	Yok	Asidik	-	—
D205	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	—
D211	<i>A. salavatliensis</i>	-	Yok	Yok	—	-	Zayıf
D213	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
D214	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	—
D221a	<i>A. salavatliensis</i>	-	Yok	Yok	—	-	Zayıf
D232a	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	Çok iyi
D242b	<i>A. salavatliensis</i>	++	İyi	Yok	Asidik	-	—
D243	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	Zayıf
D392	<i>A. salavatliensis</i>	-	İyi	Yok	Bazik	-	—
D487	<i>A. salavatliensis</i>	-	Çok iyi (halka formu)	Yok	Bazik	-	İyi
D503	<i>A. salavatliensis</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	-	Zayıf
E206a	<i>A. salavatliensis</i>	-	Zayıf	Yok	Bazik	+++	Çok iyi
D591	<i>A. salavatliensis</i>	++	İyi	Yok	Asidik	-	—
DSM 27374 ^T	<i>A. suryakundensis</i>	-	İyi	Yok	Asidik	-	—
DSM 16325 ^T	<i>A. tepidamans</i>	-	Yok	Yok	—	-	İyi
DSM 17141 ^T	<i>A. thermarum</i>	-	İyi	Yok	Bazik	+	Çok iyi
DSM 17075 ^T	<i>A. voinovskiensis</i>	-	Çok iyi	Yok	Bazik	+++	Çok iyi

+, reaksiyon var, ++; güçlü reaksiyon, +++; çok güçlü reaksiyon, -; reaksiyon yok, —; üreme yok), (Halka formu; test tüp çeperinde gözlenen bu yapı biyofilm üreticisi bakterilerin varlığına işaret etmektedir (Römling 1998)

4.4 TSB/Standart Tam Yağlı Süt İçeriklerindeki Biyofilm Üretim Kapasitelerine ve Fenotipik Karakteristiklerine (Laktoz Fermentasyonu/Kazein Hidrolizi) Göre Seçilen Bakterilerin Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Biyofilm Üretim Miktarlarının Belirlenmesi

Farklı inkübasyon koşullarında, iki farklı besiyeri içeriğinde [(standart TSB, NaCl'siz TSB)] ve standart tam yağlı süt (% 10'luk Skim Milk)] içeriğinde güçlü birer biyofilm üreticisi olduğu saptanan ve fenotipik karakteristiklerine (laktoz fermentasyonu/kazein hidrolizi) göre seçilen 23 *Geobacillus* (8) ve *Anoxybacillus* (15) cinsi bakteri çizelge 4.6'da listelenmiştir. Bu sürece kadar yürütölen tüm çalışmalar, mevcut *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyeleri arasından en ideal izolat ve referansları seçmek adına gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada seçilen 23 bakterinin seçim kriteri gıda endüstrisinde gıdaların işlendiği ve sıklıkla tercih edilen 316 L tipi paslanmaz elik kuponlar üzerindeki ve standart tam yağlı süt içerisindeki biyofilm üretim davranışları araştırılmıştır. Seçilen bakterilerin biyofilm örnekleme si yine iki kritik inkübasyon sıcaklığında (55 °C-65 °C) 48 süresince standart tam yağlı süt içerisinde yapılmıştır. Çizelge 4.6 bu zamana kadar ideal termofilik basil seçimi için yürütölen seçim çalışmalarının özeti mahiyetindedir ve paslanmaz elik üzerinde geliştirilen biyofilm örneklerinden yapılan sayımlar logaritmik ölçekte verilmiştir. Seçilen 23 bakterinin paslanmaz elik yüzeyler üzerinde ürettikleri biyofilmlerin sayım sonuçları şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Seçilen 23 bakterinin paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm üretim kapasiteleri (*Seçilen bakterileri işaret etmektedir)

Çizelge 4.6 Paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretim miktarları saptanacak olan 23 bakterinin biyofilm üretim ve fenotipik karakteristikleri

GEOBACILLUS															
Lab. Kodu	İzolat-Referans	48 saat-55°C-NaCl içeren TSB besiyeri	96 saat-55°C-NaCl içeren TSB besiyeri	48 saat-55°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	96 saat-55°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	48 saat-65°C-NaCl içeren TSB besiyeri	96 saat-65°C-NaCl içeren TSB besiyeri	48 saat-65°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	96 saat-65°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	48 saat-55°C-RSM-Polistiren	48 saat-65°C-RSM-Polistiren	48 saat-55°C-RSM-Çelik yüzey (log/cm ²)	48 saat-65°C-RSM-Çelik yüzey (log/cm ²)	L*	K*
A353	<i>Geobacillus</i> sp.	0,024	0,000	0,003	0,014	0,210	0,265	0,109	0,231	0,289	1,087	-	2,51	+	+
		UD	UD	UD	UD	G	G	O	G	Z	O				
DSM 2542 ^T	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,007	0,023	0,141	1,041	0,192	0,121	0,040	0,096	0,225	0,829	1,70	2,72	-	-
		UD	UD	O	G	O	O	UD	G	UD	O				
DSM 465 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,031	0,061	0,021	0,047	0,336	1,332	0,067	0,542	0,160	0,327	1,40	4,08	-	-
		UD	UD	UD	UD	G	G	O	G	UD	UD				
BS4a	<i>G. thermoglucosidans</i>	0,315	0,030	0,018	0,118	0,033	0,346	0,067	0,283	0,236	1,126	3,59	4,88	-	+
		G	UD	UD	Z	Z	O	O	O	UD	O				
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>	0,016	0,052	0,003	0,031	0,045	1,690	0,047	0,535	0,195	1,490	5,12	-	+	+
		UD	UD	UD	UD	O	G	Z	G	UD	O				
DSM 14590 ^T	<i>G. toebii</i>	0,035	1,873	0,020	0,216	0,242	1,932	0,247	3,911			4,51	-	-	-
		UD	G	UD	O	G	G	G	G						
DSM 7263 ^T	<i>G. kaustophilus</i>	0,118	0,024	0,073	0,233	0,342	0,729	0,205	2,964	0,159	0,441	3,00	-	-	+
		O	UD	O	O	G	G	G	G	UD	Z				
DSM 13174 ^T	<i>G. vulcanii</i>	0,034	0,008	0,020	0,033	0,094	0,442	0,079	1,382	0,277	0,622	4,40	2,30	+	+
		UD	UD	UD	UD	G	G	O	G	Z	Z				

Çizelge 4.6 Paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretim miktarları saptanacak olan 23 bakterinin biyofilm üretim ve fenotipik karakteristikleri (devam)

ANOXYBACILLUS															
Lab. Kodu	İzolat-Referans	48 saat-55°C-NaCl içeren TSB besiyeri	96 saat-55°C-NaCl içeren TSB besiyeri	48 saat-55°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	96 saat-55°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	48 saat-65°C-NaCl içeren TSB besiyeri	96 saat-65°C-NaCl içeren TSB besiyeri	48 saat-65°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	96 saat-65°C-NaCl içermeyen TSB besiyeri	48 saat-55°C-RSM-Polistiren	48 saat-65°C-RSM-Polistiren	48 saat-55°C-RSM-Çelik yüzey (log/cm ²)	48 saat-65°C-RSM-Çelik yüzey (log/cm ²)	L*	K*
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,034	0,770	0,015	0,718	0,271	0,563	0,183	0,797	0,203	2,119	1,70	-	+	+
		UD	G	UD	G	G	G	O	G	O	G				
D52b	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,027	0,018	0,004	2,485	0,018	0,092	0,007	0,036	0,180	1,927	2,18	1,39	-	-
		UD	UD	UD	G	UD	Z	UD	UD	O	G				
D242b	<i>A. salavatliensis</i>	0,120	0,081	0,077	0,069	0,277	0,152	0,111	0,096	0,375	0,504	1,70	-	+	-
		O	O	O	O	G	G	O	Z	G	G				
NCIB 13972 ^T	<i>A. ayderensis</i>	0,238	4,000	0,059	4,000	0,071	0,196	0,050	0,153	0,283	0,893	2,86	-	+	+
		G	G	Z	G	O	Z	Z	Z	G	O				
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i>	0,531	0,017	0,032	0,044	0,229	0,103	0,023	0,147	0,232	0,428	2,91	4,64	-	-
		G	UD	UD	UD	G	Z	UD	Z	G	Z				
C245	<i>A. salavatliensis</i>	0,034	0,050	0,023	0,012	0,016	0,116	0,022	0,277	0,142	0,236	4,38	1,70	-	-
		UD	UD	UD	UD	UD	Z	UD	O	O	UD				
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,033	0,028	0,026	0,059	0,009	0,093	0,022	0,133	0,178	0,586	4,90	3,27	+	-
		UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	Z	O	O				
D591	<i>A. salavatliensis</i>	0,017	0,026	0,073	0,044	0,245	0,617	0,196	0,247	3,096	0,716	2,00		+	-
		UD	UD	Z	Z	G	G	O	G	G	G				
D594	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>	0,017	0,002	0,020	0,061	0,151	0,137	0,010	0,382	1,857	1,685	4,76	3,44	-	+
		UD	UD	UD	UD	G	Z	UD	O	G	G				
DSM 15730 ^T	<i>A. caldiproteolyticus</i>	0,037	0,022	0,050	0,027	0,151	0,483	0,029	0,157	0,433	1,023	3,96	-	-	+
		Z	UD	UD	Z	O	G	UD	G	O	G				
DSM 16325 ^T	<i>A. tepidamans</i>	0,592	0,833	0,474	0,633	0,089	0,341	0,098	0,496	0,550	0,355	5,47	3,90	+	-
		G	G	G	G	G	O	O	G	G	O				
DSM 17141 ^T	<i>A. thermarum</i>	0,087	0,138	0,054	0,118	0,258	0,100	0,059	0,117	1,134	0,529	4,04	2,00	-	+
		G	O	UD	G	G	Z	Z	G	G	G				
DSM 17075 ^T	<i>A. voinovskiensis</i>	0,078	0,266	0,120	0,292	0,084	0,774	0,072	1,563	1,278	0,661	4,53	-	-	+
		Z	O	O	O	O	G	O	G	G	G				
DSM 23293	<i>A. flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i>	0,422	2,964	0,288	2,261	0,461	3,537	1,119	3,630	1,407	0,901	3,30	1,39	-	+
		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G				
DSM 27374 ^T	<i>A. suryakundensis</i>	0,032	0,028	0,023	0,006	0,014	0,097	0,019	0,112	2,619	0,611	5,46	-	-	-

*L; laktoz fermentasyonu, K; kazein hidrolizi

Nihai olarak bakterilerin gerek TSB/Standart Tam Yağlı Süt içeren ortamlardaki polistiren yüzeylerde biyofilm üretim potansiyelleri, gerekse ara seçimle belirlenen 23 bakterinin “standart tam yağlı süt” içeren ortamlardaki paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm üretim potansiyelleri ve laktoz fermentasyonu/kazein hidrolizi gibi fenotipik özellikleri baz alınarak daha ileriki çalışmaların yürütülmesi adına toplam 8 *Geobacillus* (4) ve *Anoxybacillus* (4) cinsine dahil referans suş ve izolat seçimi tamamlanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 İleriki çalışmaları devam ettirmek adına seçilen bakterilerin listesi

İzolat ve Referans kodları	İzolat/Referans adı
DSM 465 ^T	<i>G. thermodenitrificans</i>
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>
D195	<i>G. thermodenitrificans</i>
DSM 13174 ^T	<i>G. vulcanii</i>
A403	<i>A. caldiproteolyticus</i>
DSM 2641 ^T	<i>A. flavithermus</i>
F81	<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i>
DSM 16325 ^T	<i>A. tepidamans</i>

4.5 Farklı Çevresel Parametrelerin Termofilik *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Biyofilmleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

4.5.1 Tuzluluğun termofilik basillerin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişime olan etkileri

Daha önceki çalışmalar dahilinde seçimi tamamlanan *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine üye izolatların ve referans suşların farklı konsantrasyonda NaCl (% 0,0,-0,5, 1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5-4,0-4,5-5,0) içeren TSB besiyerlerindeki, iki farklı inkübasyon sıcaklığındaki (55, 65 °C, pH 7,3) ve 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretim miktarları şekil 4.10-4.19’da verilmiştir. Çalışma dahilindeki 8 bakteri için de farklı tuz konsantrasyonlarında ve inkübasyon sıcaklıklarındaki ideal biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim koşulları istatistiksel olarak da saptanmıştır (Tukey Testi, $p < 0,05$). Ayrıca inkübasyon sıcaklıklarının ve farklı tuz konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerindeki etkileri kombine olarak değerlendirilmiş (Univariate Analizi, $p < 0,05$) ve tanımlanan koşullar

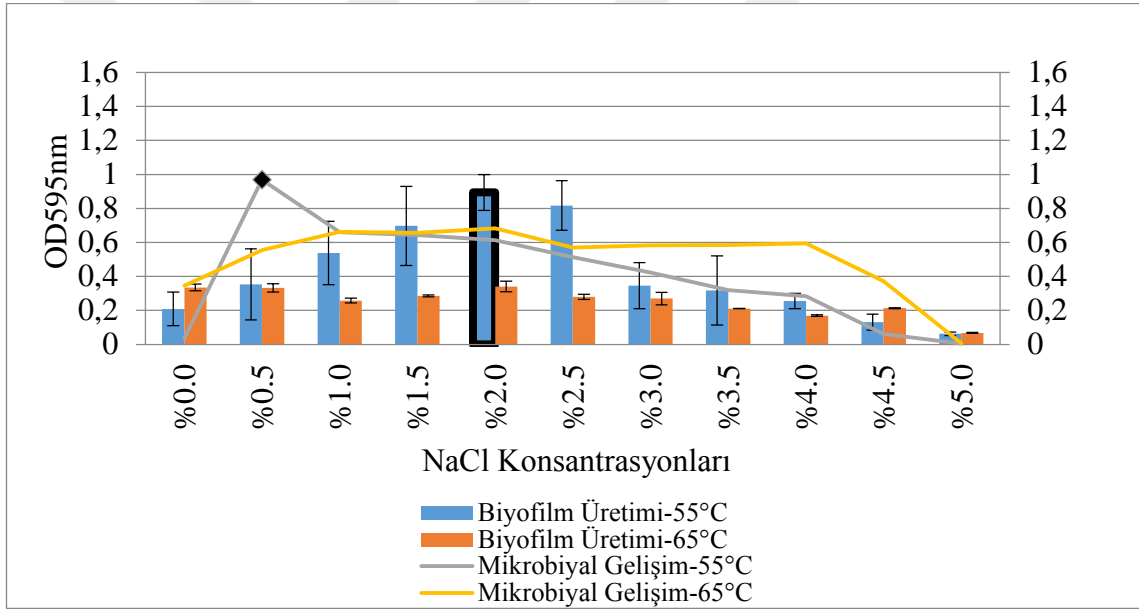
dahilinde mikrobiyal gelişim-biyofilm üretimi arasındaki korelasyonlar da belirlenmiştir (Pearson Korelasyonu, $p < 0,05$), (Çizelge 4.8 - 4.17).

“Univariate” analizlerinin sonuçları ele alındığında gerek tür düzeyinde gerekse her iki cinsin kümülatif olarak değerlendirilmesi neticesinde, iki farklı kritik inkübasyon sıcaklığının (55, 65 °C, pH 7,3) ve farklı NaCl konsantrasyonlarının hem bağımsız birer değişken olarak hem de kombine değişkenler olarak biyofilm üretimi üzerinde anlamlı etkileri olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8 - 4.17). “Univariate” analizlerinin mikrobiyal gelişim üzerindeki etkileri dikkate alındığında *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *G. thermodenitrificans* D195 bakterilerinde tercih edilen inkübasyon sıcaklıklarının belirleyici olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.9 -4. 10 ve Şekil 4.15). Yine tüm *Anoxybacillus* üyelerinin farklı tuz konsantrasyonlardaki mikrobiyal gelişim eğilimleri değerlendirildiğinde “inkübasyon sıcaklığı-NaCl konsantrasyonları” kombine etkisinin belirleyici olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.12). Her iki cinse de üye tüm izolatların ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri arasındaki ilişkilere bakıldığında belirli düzeylerde pozitif yönde bir korelasyon saptanmıştır (Çizelge 4.8 - 4.17).

Anoxybacillus cinsine dahil *A. caldiproteolyticus* A403 ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatlarında oldukça yüksek tuz toleransı saptanmış olup, bu izolatlar yüksek tuz konsantrasyonlarında en yüksek düzeyde biyofilm üretim miktarlarına ulaşmıştır (% 2,0 ve 2,5), (Şekil 4.10, 4.12). *A. flavithermus* DSM 2641 referans suşu biyofilm üretimi itibariyle en düşük tuz toleransını gösteren bakteri olarak belirlenmiştir (% 0,0), (Şekil 4.11). *A. tepidamans* DSM 16325^T referans suşunda ise çok geniş bir tuz konsantrasyon aralığında mikrobiyal gelişim saptanmış olup, bu suş NaCl içermeyen besi ortamında en yüksek düzeyde biyofilm üretim miktarına ulaşsa da, belirtilen tuz konsantrasyonlarında mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretim eğilimleri arasında yüksek bir korelasyon saptanmıştır ($r: 0,618$, $p < 0,05$), (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.11).

Geobacillus cinsine dahil *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunda yüksek tuz konsantrasyonlarında mikrobiyal gelişim saptanabilirken, biyofilm gelişimi için

düşük tuz konsantrasyonlarının daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.15, Çizelge 4.13). *G. thermoglucosidans* B84a izolatının ise hem mikrobiyal gelişim için hem de biyofilm üretimi için düşük düzeyde tuz konsantrasyonuna gereksinim duyduğu görülmektedir (% 0,0 ve % 0,5), (Şekil 4.16, Çizelge 4.14). *G. vulcanii* DSM 13174^T suşu ise gerek mikrobiyal gelişimi için gerekse biyofilm üretimi için düşük tuz toleransı sergilemektedir (Şekil 4.18, Çizelge 4.16). “Univariate” analizleri dahilinde her bir bakterinin anlamlı düzeyde ve en yüksek miktarda mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi gösterdiği değerler çizelgelerde sunulmuştur. Son olarak çalışmadaki *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* üyelerinin “en ideal” düzeyde mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi gösterdiği değerler çizelge 4.18’de verilmiştir.

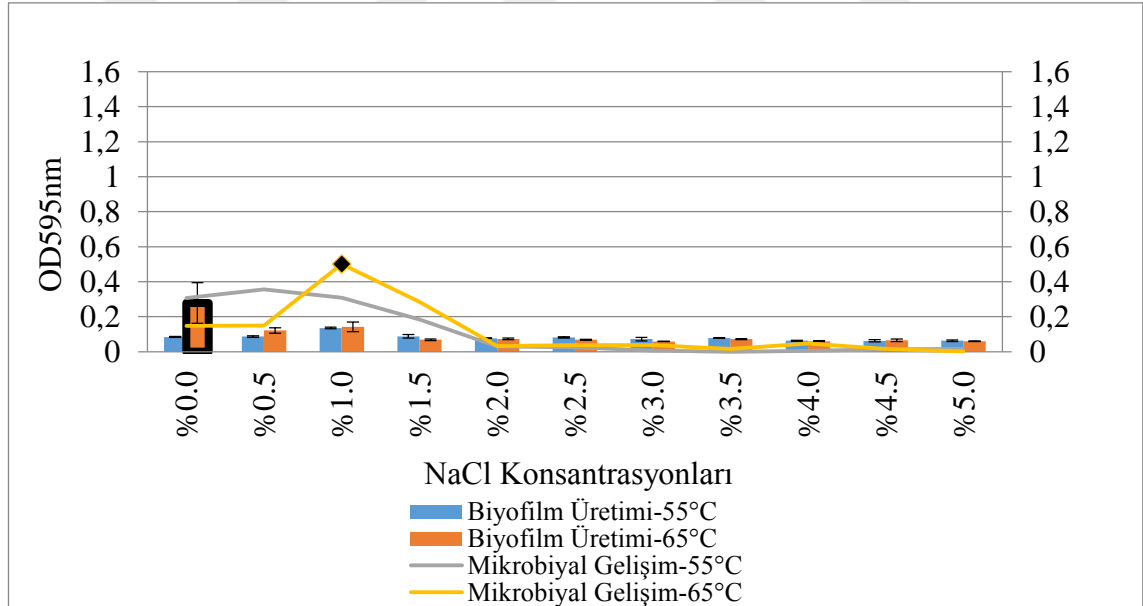


Şekil 4.10 *A. caldiproteolyticus* A420 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.8 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. caldiproteolyticus* A403)

A. caldiproteolyticus A403					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	7,345	,000	Model	,000	,000
Intercept	383,082	,000	Intercept	,000	,000
NaCl Konsantrasyonları	8,554	,000	NaCl Konsantrasyonları	,000	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	24,031	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	,000	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	4,467	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	,000	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 1,0-2,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 0,5-2,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,384-Zayıf korelasyon					

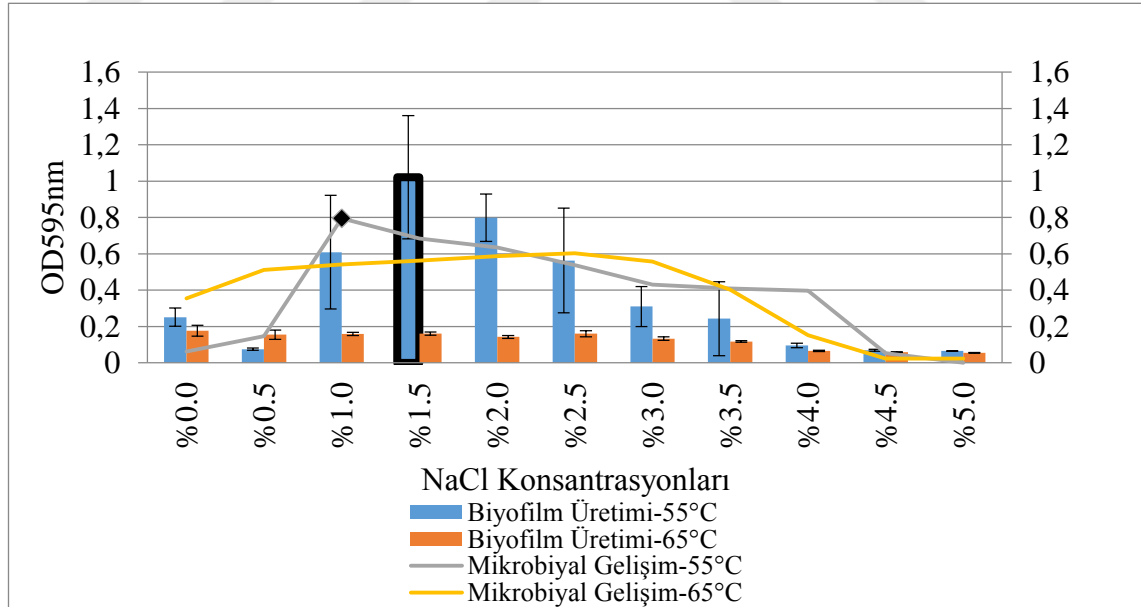


Şekil 4.11 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.9 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. flavithermus* DSM 2641^T)

<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	10,371	,000	Model	73,690	,000
Intercept	773,002	,000	Intercept	1.005,955	,000
NaCl Konsantrasyonları	12,981	,000	NaCl Konsantrasyonları	134,049	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	6,285	,016	İnkübasyon Sıcaklıkları	,063	,803
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	8,171	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	20,693	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,0-1,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 1,0 (Belirtilen konsantrasyon azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyondur).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,360 -Zayıf korelasyon					

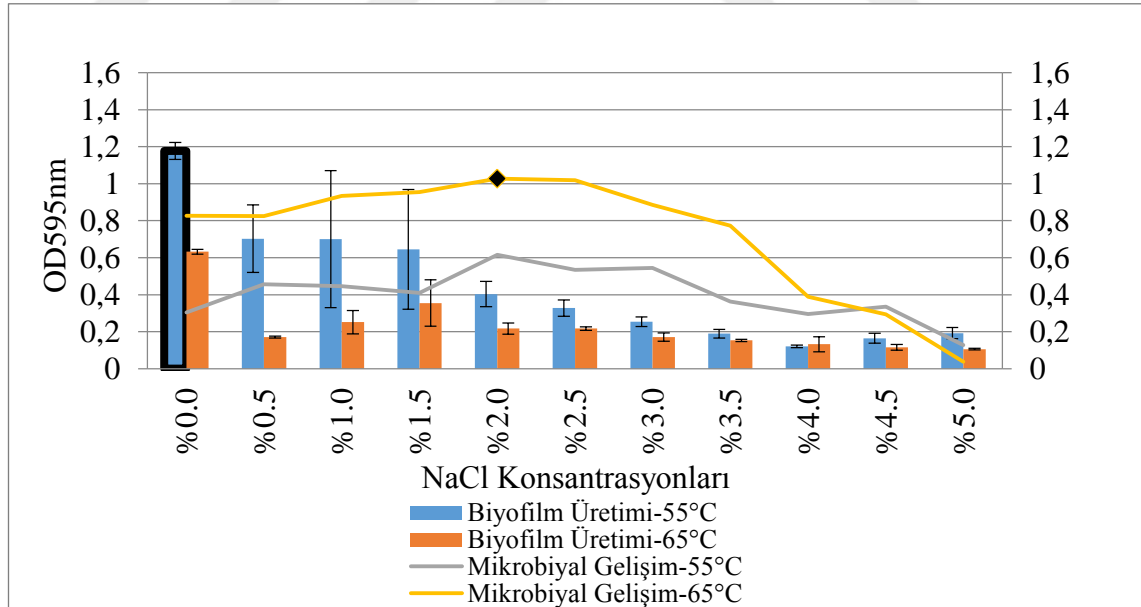


Şekil 4.12 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.10 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81)

A. kamchatkensis subsp. asaccharedens F81					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	12,161	,000	Model	30,970	,000
Intercept	242,293	,000	Intercept	1.663,642	,000
NaCl Konsantrasyonları	11,364	,000	NaCl Konsantrasyonları	55,264	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	59,633	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	,617	,436
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	8,212	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	9,711	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 1,0-2,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 0,0 ve 0,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,492-Orta şiddette korelasyon					

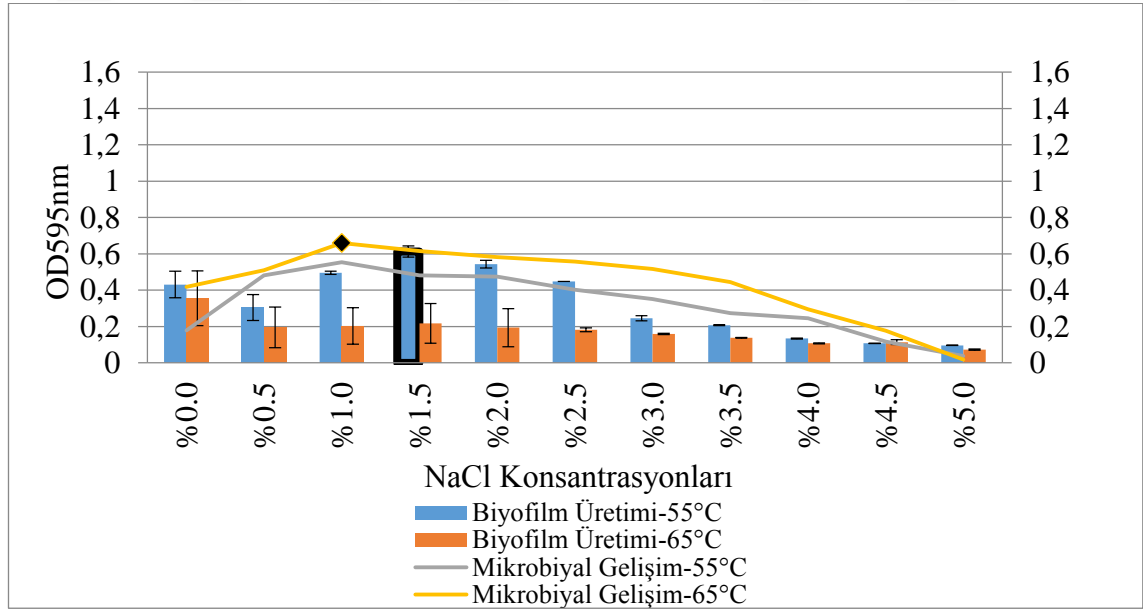


Şekil 4.13 *A. tepidamans* DSM 16325^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

Çizelge 4.11 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. tepidamans* DSM 16325^T)

A. tepidamans DSM 16325 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	15,734	,000	Model	29,169	,000
Intercept	530,030	,000	Intercept	1.053,518	,000
NaCl Konsantrasyonları	23,149	,000	NaCl Konsantrasyonları	16,660	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	53,413	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	406,335	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	4,550	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	3,961	,001
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,0 (Belirtilen konsantrasyon azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyondur).			% 0,0-4,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,618-Yüksek korelasyon					

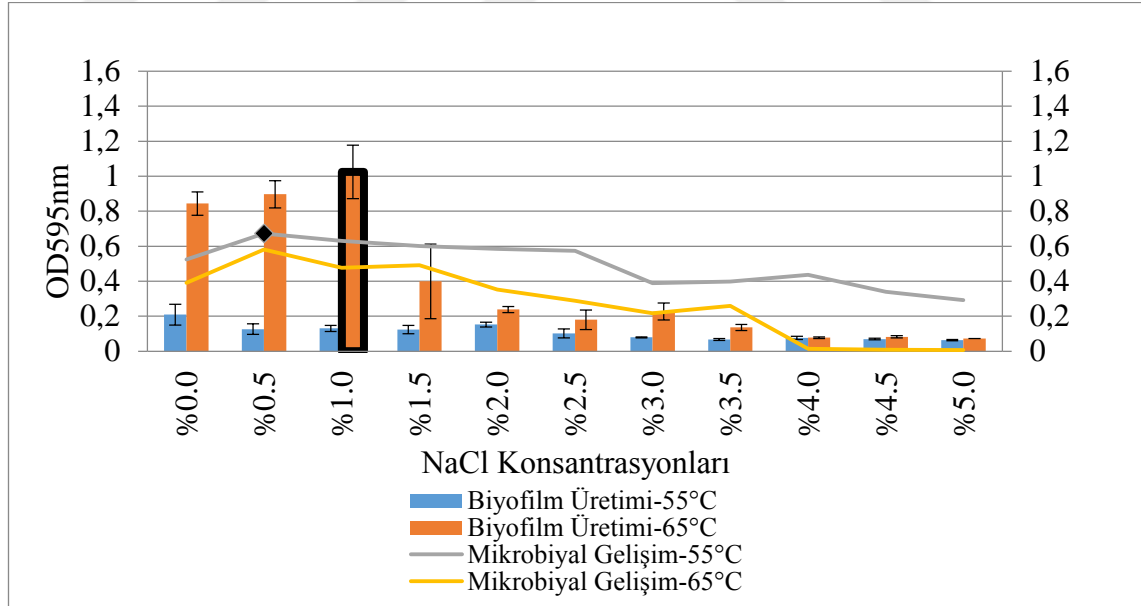


Şekil 4.14 Tüm *Anoxybacillus* üyelerinin farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir)

Çizelge 4.12 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (Tüm *Anoxybacillus* üyeleri)

Tüm <i>Anoxybacillus</i> Üyeleri					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	6,871	,000	Model	7,200	,000
Intercept	375,876	,000	Intercept	646,833	,000
NaCl Konsantrasyonları	8,174	,000	NaCl Konsantrasyonları	13,205	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	33,989	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	13,456	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	2,857	,002	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	,569	,839
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,0-2,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 0,5-3,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,283 -Zayıf korelasyon					

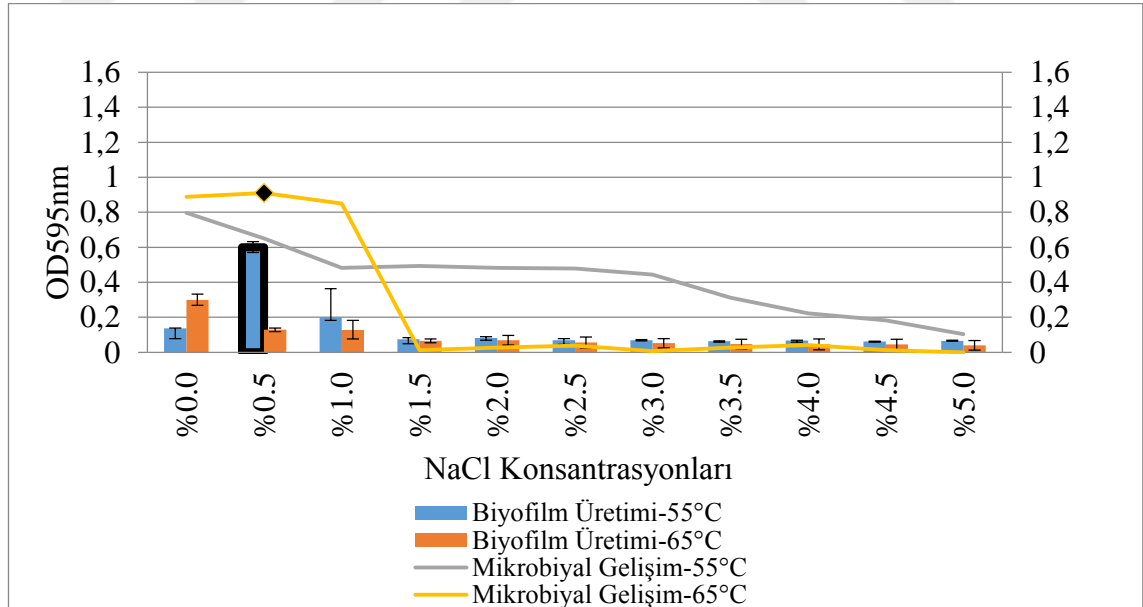


Şekil 4.15 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir)

Çizelge 4.13 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T)

<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	61,308	,000	Model	29,169	,000
Intercept	970,788	,000	Intercept	1.053,518	,000
NaCl Konsantrasyonları	57,984	,000	NaCl Konsantrasyonları	16,660	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	298,631	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	406,335	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	40,900	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	3,961	,001
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,0-1,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 0,5-2,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,591-Orta şiddette korelasyon					

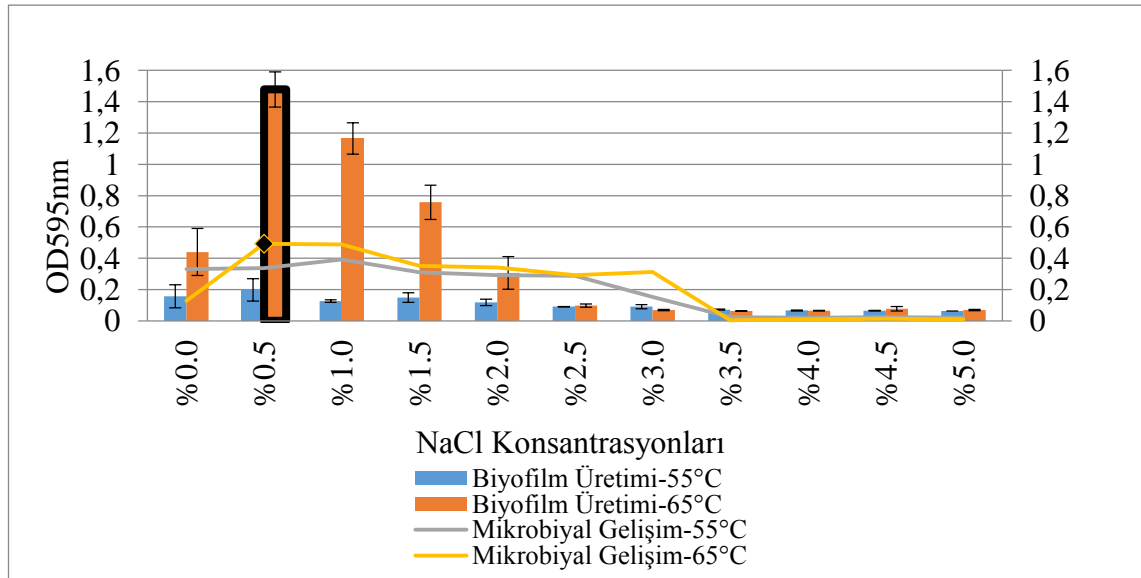


Şekil 4.16 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

Çizelge 4.14 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermoglucosidans* B84a)

<i>G. thermoglucosidans</i> B84a					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	119,437	,000	Model	133,289	,000
Intercept	1.248,356	,000	Intercept	3.227,935	,000
NaCl Konsantrasyonları	119,757	,000	NaCl Konsantrasyonları	204,301	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	427,411	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	194,037	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	88,320	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	56,202	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,5 (Belirtilen konsantrasyon azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyondur).			% 0,0 ve 0,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,518-Orta şiddette korelasyon					

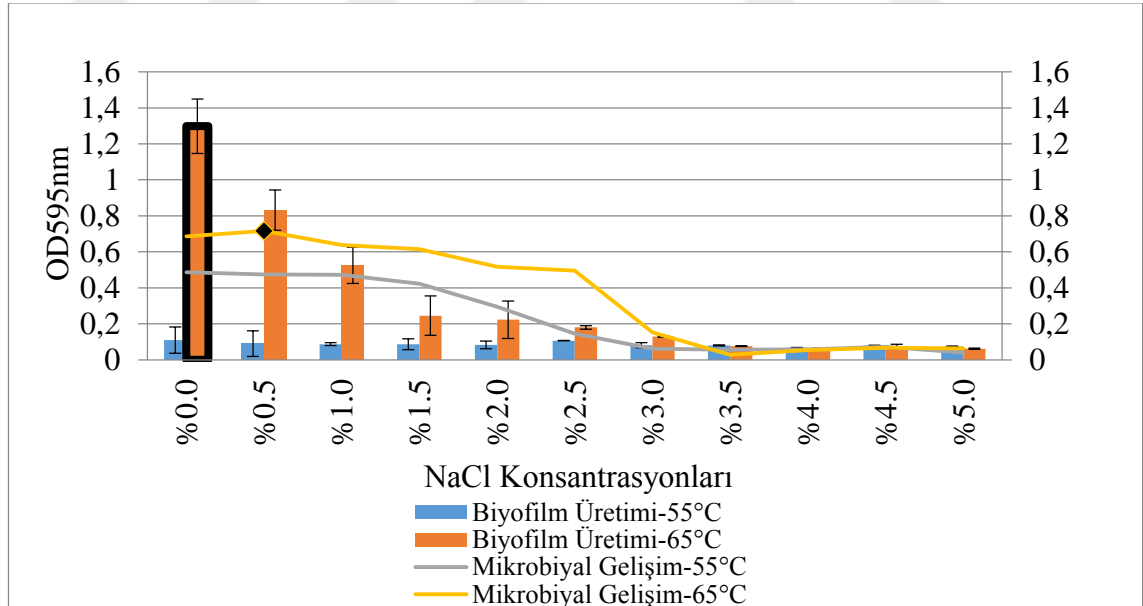


Şekil 4.17 *G. thermodenitrificans* D195 izolatının farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.15 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermodenitrificans* D195)

<i>G. thermodenitrificans</i> D195					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	119,437	,000	Model	32,952	,000
Intercept	1.248,356	,000	Intercept	1.109,386	,000
NaCl Konsantrasyonları	119,757	,000	NaCl Konsantrasyonları	63,191	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	427,411	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	3,321	,075
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	88,320	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	5,675	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,5 (Belirtilen konsantrasyon azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyondur).			% 0,5-2,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,672 -Yüksek korelasyon					

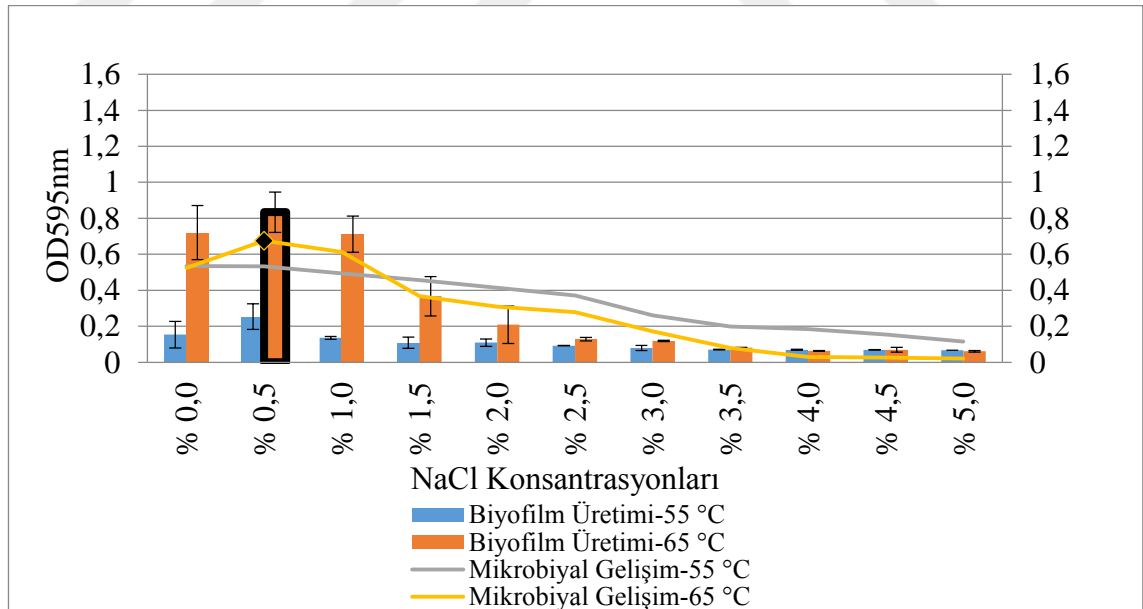


Şekil 4.18 *G. vulcanii* DSM 13174^T referans suşunun farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

Çizelge 4.16 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G.vulcanii* DSM 13174^T)

<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	166,080	,000	Model	87,844	,000
Intercept	1.776,506	,000	Intercept	2.781,592	,000
NaCl Konsantrasyonları	149,312	,000	NaCl Konsantrasyonları	160,326	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	626,831	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	133,858	,000
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	136,772	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	10,761	,000
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 1,0 (Belirtilen konsantrasyon azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyondur).			% 0,0-1,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,476-Orta şiddette korelasyon					



Şekil 4.19 Tüm *Geobacillus* üyelerinin farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerindeki biyofilm üretim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

Çizelge 4.17 NaCl konsantrasyonlarının iki farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (Tüm *Geobacillus* üyeleri)

Tüm <i>Geobacillus</i> Üyeleri					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	18,637	,000	Model	18,688	,000
Intercept	320,045	,000	Intercept	969,072	,000
NaCl Konsantrasyonları	21,135	,000	NaCl Konsantrasyonları	36,194	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	71,091	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	8,026	,005
NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	10,893	,000	NaCl Konsantrasyonları *İnkübasyon Sıcaklıkları	2,247	,016
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal NaCl Konsantrasyonları) p<0,05		
% 0,0-1,0 (Belirtilen konsantrasyonlar azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			% 0,0-1,5 (Belirtilen konsantrasyonlar azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği konsantrasyonlar olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,428-Orta şiddette korelasyon					

Çizelge 4.18 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyelerinin mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri için gereken en ideal NaCl konsantrasyonları

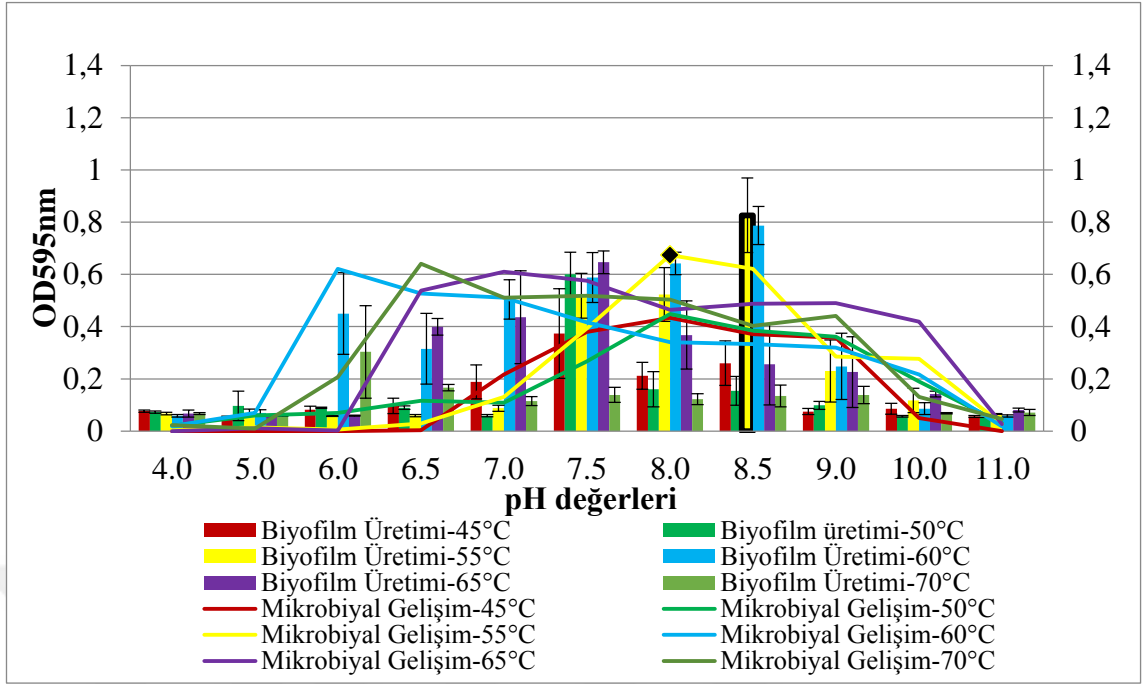
	Biyofilm üretimi (% NaCl)	Mikrobiyal Gelişim (% NaCl)
<i>A.caldiproteolyticus</i> A403	2,0	0,5
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	0,0	1,0
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81	1,5	1,0
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T	0,0	2,0
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	1,0	0,5
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a	0,5	0,5
<i>G. thermodenitrificans</i> D195	0,5	0,5
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T	0,0	0,5

4.5.2 Sıcaklığın ve pH'nın termofilik basillerin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişime olan etkileri

Farklı pH (pH 4,0-5,0-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0-10,0-11,0) ve inkübasyon sıcaklığı değerlerinin (45, 50, 55, 60, 65, 70 °C) biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerinde olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, TSB besiyeri içerikleri her bir izolatu ve referans suşun, bir önceki çalışmada elde edilen biyofilm gelişimindeki ideal tuz

gereksinimlerine göre modifiye edilmiştir (Çizelge 4.18). İlgili çevresel parametrelerin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerindeki etkileri Şekil 4.20-4.27’de verilmiştir. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının ve pH değerlerinin biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerindeki etkileri arasındaki farklar “Tek Yönlü Varyans Analizi” ve Tukey Testi” esas alınarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Çizelge 4.19, 4.21, 4.23, 4.25, 4.27, 4.29, 4.31 ve 4.33’te her bir *Anoxybacillus/Geobacillus* izolat ve referansı için mikrobiyal gelişimin ve biyofilm üretiminin gözlemlendiği değerler işaretlenmiştir. Çizelgelerde izolat ve referanslar sırasıyla verilmiş, her çizelgede belirtilen en ideal mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretim koşulları “Tek Yönlü Varyans Analizi” ve “Tukey Testi” esas alınarak saptanmıştır ($p<0,05$). Biyofilm üretimlerinin saptandığı sıcaklık ve pH değerlerinde “cut-off” değerlerine göre “güçlü” biyofilm üretim karakteristikleri esas alınmıştır. Mikrobiyal gelişim içinse pozitif değerler olarak “OD595nm ≥ 0.2 ” yoğunlukları dikkate alınmıştır.

Temel çevresel parametrelerin termofilik basillerin üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, farklı inkübasyon sıcaklıklarında, farklı pH değerlerine sahip besiyerlerinde *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye 8 bakteri için ideal biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim koşulları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tukey Testi, $p<0,05$). Ayrıca inkübasyon sıcaklıklarının ve farklı pH değerlerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerindeki etkileri kombine olarak değerlendirilmiş (Univariate Analizi, $p<0,05$) ve tanımlanan koşullar dahilinde mikrobiyal gelişim-biyofilm üretimi arasındaki korelasyonlar da belirlenmiştir (Pearson Korelasyonu, $p<0,05$), (Çizelge 4.20, 4.22, 4.24, 4.26, 4.28, 4.30, 4.32 ve 4.34).



Şekil 4.20 *A. caldiproteolyticus* A420 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

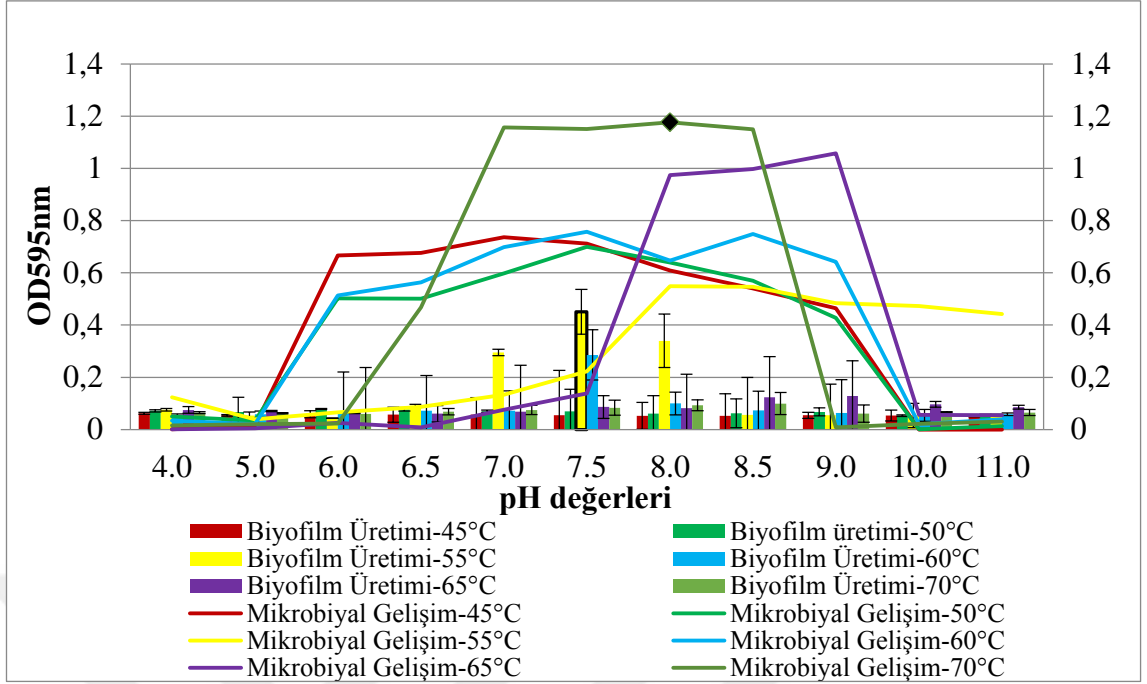
Çizelge 4.19 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. caldiproteolyticus* A403)

<i>A. caldiproteolyticus</i> A403					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	23,780	,000	Model	18,884	,000
Intercept	1.689,307	,000	Intercept	1.671,423	,000
pH	73,345	,000	pH	73,690	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	49,372	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	21,929	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	11,308	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	7,619	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 7,5- 8,5 (Belirtilen pH değerleri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			pH 7,0-9,0 (Belirtilen pH değerleri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
55 °C, 65 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklıkları azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).			60 °C, 65 °C, 70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklıkları azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,558 -Orta şiddette korelasyon					

Çizelge 4.20 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*A. caldiproteolyticus* A403).

		<i>A. caldiproteolyticus</i> A403											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 55 °C-pH 8,0 (% 0,5 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 55 °C-pH 8,5 (% 2,0 NaCl)													

A. caldiproteolyticus A403 izolatında en ideal biyofilm üretimi 55 °C’de pH 8,5’te saptanmıştır (Şekil 4.20). Çalışılan tüm sıcaklıklarda (45-70 °C) mikrobiyal gelişim saptanırken, biyofilm üretimi 45-65 °C arası sıcaklıklarda saptanmıştır. Bu izolatın yüksek inkübasyon sıcaklıklarındaki mikrobiyal gelişiminde görülen alkali tolerans dikkat çekmektedir (Çizelge 4.20).



Şekil 4.21 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

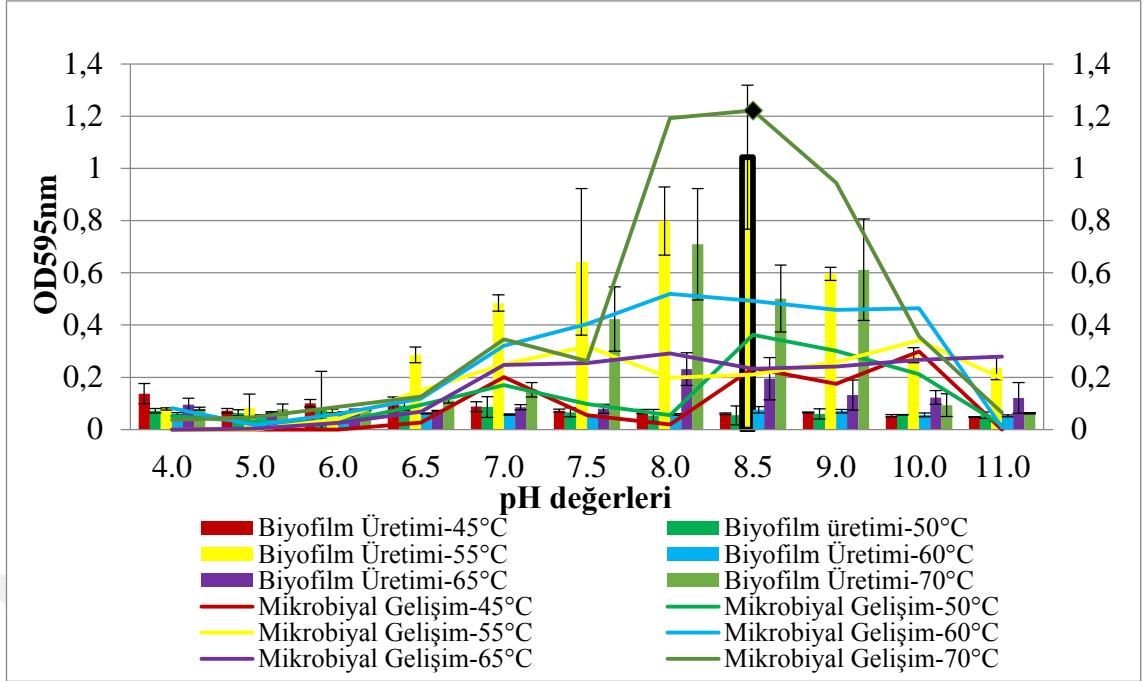
Çizelge 4.21 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. flavithermus* DSM 2641^T)

<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	34,873	,000	Model	42,325	,000
Intercept	3.404,244	,000	Intercept	2.954,424	,000
pH	52,291	,000	pH	153,107	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	74,033	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	17,505	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	27,474	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	22,651	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 7,5 (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			pH 7,0-8,5 (Belirtilen pH değerleri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
55 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			65 °C, 70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklıkları azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,126 -Korelasyon yok					

Çizelge 4.22 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*A. flavithermus* DSM 2641^T).

	Sıcaklık	<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 8,0 (% 1,0 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 55 °C-pH 7,5 (% 0,0 NaCl)													

A. flavithermus DSM 2641^T referans suşunda en ideal biyofilm üretimi 55 °C’de pH 7,5’te saptanmıştır (Şekil 4.21). Bu suşta mikrobiyal gelişim tüm sıcaklık değerlerinde ve geniş bir pH aralığında saptanırken (45-70 °C), biyofilm üretimi dar bir inkübasyon sıcaklığı ve pH aralığında saptanmıştır (Çizelge 4.22). Farklı pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim eğilimi ile biyofilm üretim eğilimi arasında korelasyon saptanmamıştır ($r: 0,126$, Pearson Korelasyonu, $p<0,05$), (Çizelge 4.21).



Şekil 4.22 A. kamchatkensis subsp. asaccharedens F81 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir

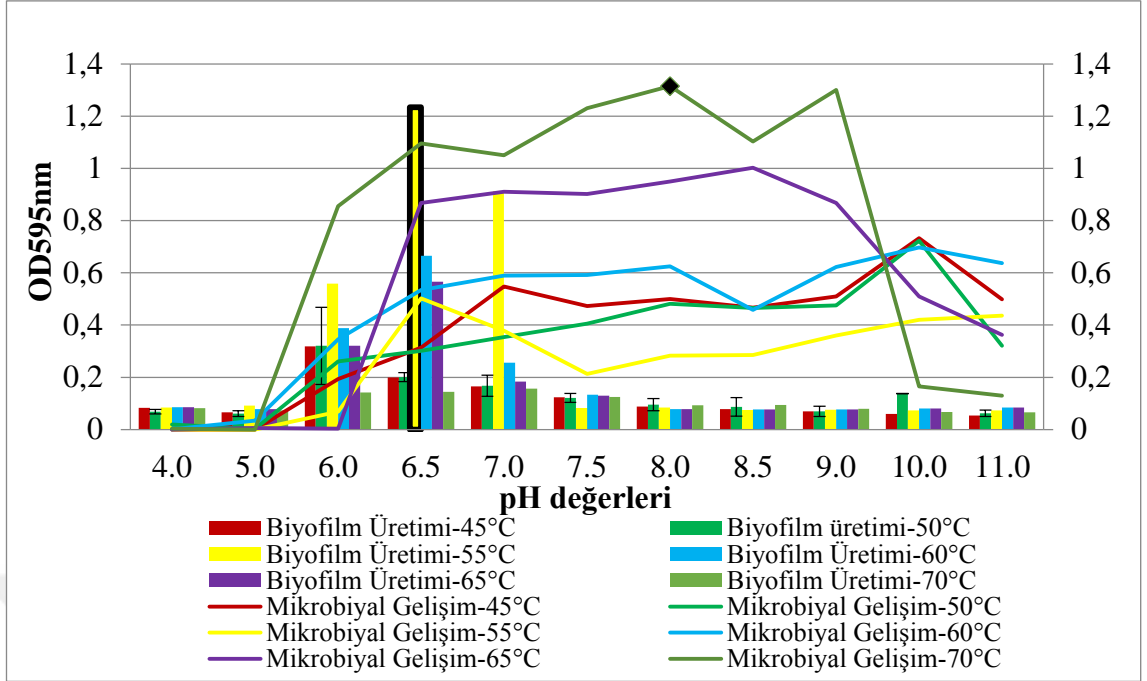
Çizelge 4.23 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (A. kamchatkensis subsp. asaccharedens F81)

A. kamchatkensis subsp. asaccharedens F81					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	26,933	,000	Model	24,994	,000
Intercept	1.137,572	,000	Intercept	1.208,179	,000
pH	34,400	,000	pH	65,587	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	142,032	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	65,933	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	13,930	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	12,781	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 8,0-9,0 (Belirtilen pH değerleri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerlerdir).			pH 8,0-9,0 (Belirtilen değerler azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
55 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değer).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,434 -Orta şiddete korelasyon					

Çizelge 4.24 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81).

		<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81											
		pH Skalası											
Sıcaklık		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 8,5 (% 1,0 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 55 °C-pH 8,5 (% 1,5 NaCl)													

F81 izolatında yine diğer *Anoxybacillus* üyelerine benzer şekilde mikrobiyal gelişim açısından daha geniş bir sıcaklık ve pH aralığında bir eğilim görülmüştür. Bu izolat dahilinde dikkat çeken bir diğer durum 55 °C'de biyofilm üretimi itibariyle geniş bir alkali toleransın görülmesidir (pH 6,5-11,0), (Çizelge 4.24). Bu izolatın en ideal biyofilm üretim koşulu 55 °C'de pH 8,5 olarak saptanmıştır. Yine yüksek inkübasyon sıcaklığında (70 °C) kayda değer düzeyde biyofilm üretimi saptanması, bu izolat için dikkate değer bir diğer durumdur (Şekil 4.22).



Şekil 4.23 A. tepidamans DSM 16325T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

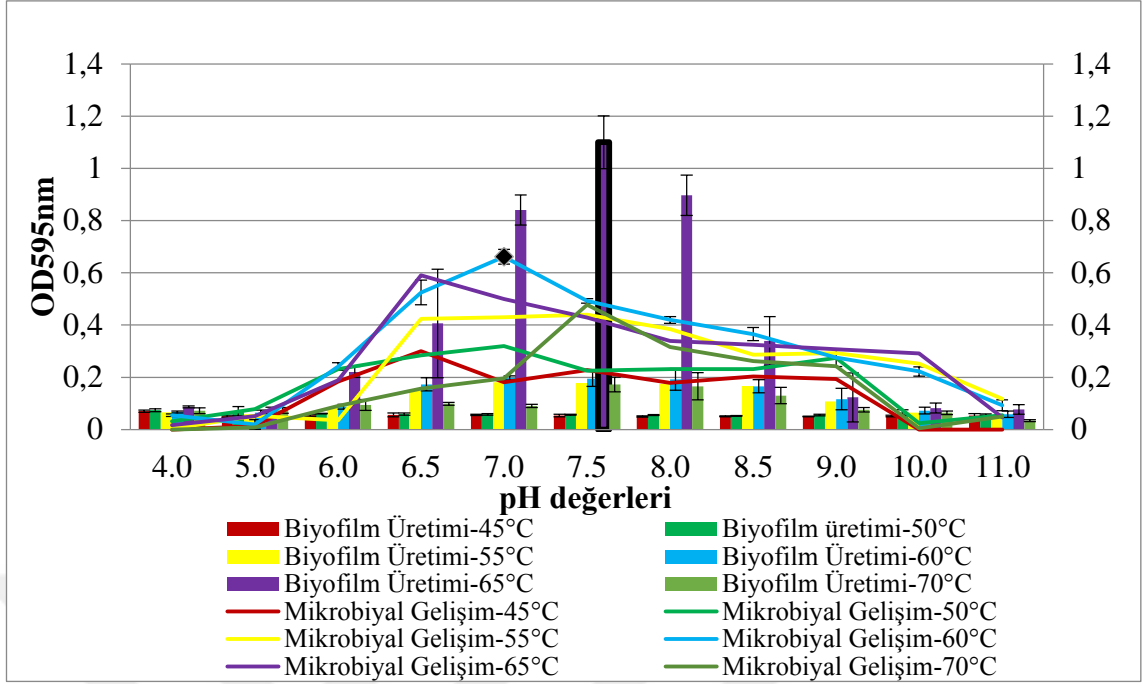
Çizelge 4.25 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*A. tepidamans* DSM 16325^T)

<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	85,171	,000	Model	51,408	,000
Intercept	3.659,648	,000	Intercept	5.729,899	,000
pH	265,953	,000	pH	161,145	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	120,973	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	135,568	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	45,435	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	21,045	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (M. gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 6,5 (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			pH 6,5-10,0 (Belirtilen değerler azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
55 °C (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değer).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,04 -Korelasyon yok					

Çizelge 4.26 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*A. tepidamans* DSM 16325^T)

		<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 8,0 (% 2,0 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 55 °C-pH 6,5 (% 0,0 NaCl)													

A. tepidamans DSM 16325^T referans suşunda en ideal biyofilm üretim koşulları pH 6,5 ve 55 °C olarak saptanmıştır (Şekil 4.23). Bu suş asidik pH değerlerinde en ideal düzeyde biyofilm üretebilen tek üye olarak saptanmıştır. Söz konusu suş yine diğer diğer *Anoxybacillus* üyelerinde de belirlendiği üzere hem geniş bir sıcaklık aralığında (45-70 °C) hem de geniş bir pH aralığında (pH 6,0-11,0, 55 °C haricinde) mikrobiyal gelişim göstermiştir (Çizelge 4.26). Bu üye dahilinde farklı pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi eğilimleri arasında korelasyon saptanmamıştır (r: 0,04, Pearson Korelasyonu, p<0,05), (Çizelge 4.25).



Şekil 4.24 *G. thermodenitrificans* DSM 465T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

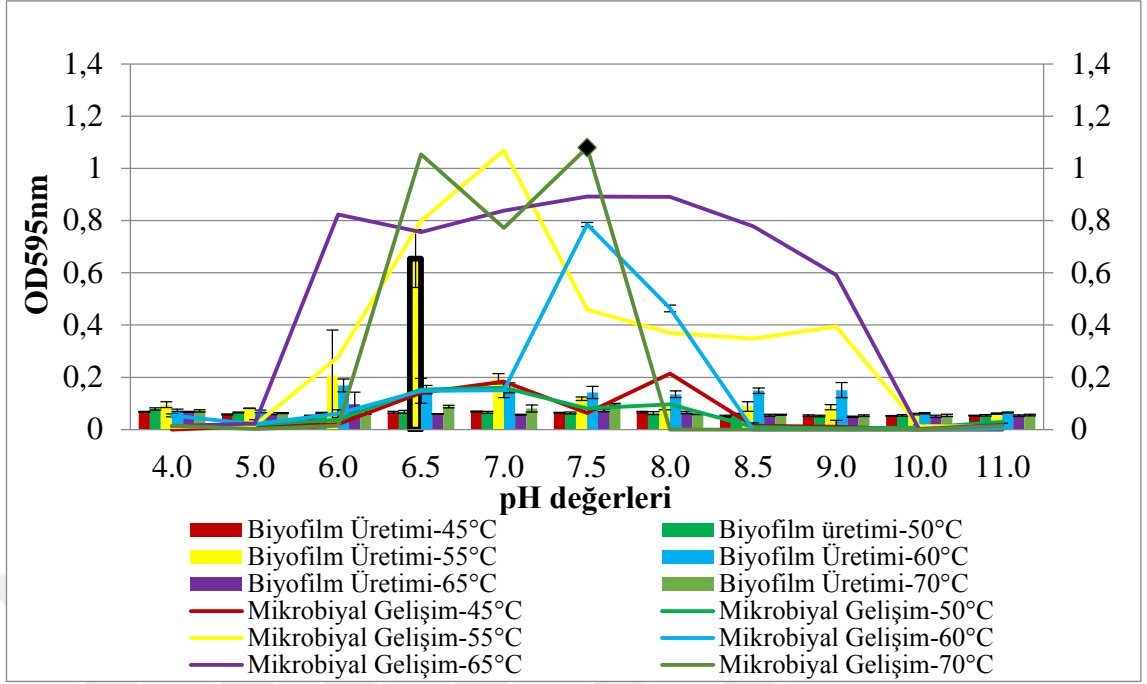
Çizelge 4.27 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T)

<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	72,227	,000	Model	51,408	,000
Intercept	2.572,168	,000	Intercept	5.729,899	,000
pH	86,329	,000	pH	161,145	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	333,017	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	135,568	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	43,328	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	21,045	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (M. gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 7,5 ve 8,0 (Belirtilen pH değerleri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerlerdir).			pH 6,5-7,5 (Belirtilen değerler azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
65 °C (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			55 °C, 60 °C, 65 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değer).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,443 -Orta şiddette korelasyon					

Çizelge 4.28 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T)

		<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 60 °C-pH 7,0 (% 0,5 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 65 °C-pH 7,5 (% 1,0 NaCl)													

G. thermodenitrificans DSM 465^T referans suşunda en ideal biyofilm koşulları olarak 65 °C inkübasyon sıcaklığı ve pH 7,5 değeri saptanmıştır. Bu suşta daha geniş bir pH ve sıcaklık skalasında mikrobiyal gelişim saptanırken, 45 °C ve 50 °C gibi düşük inkübasyon sıcaklıklarında biyofilm üretimi saptanmamıştır (Çizelge 4.28).



Şekil 4.25 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

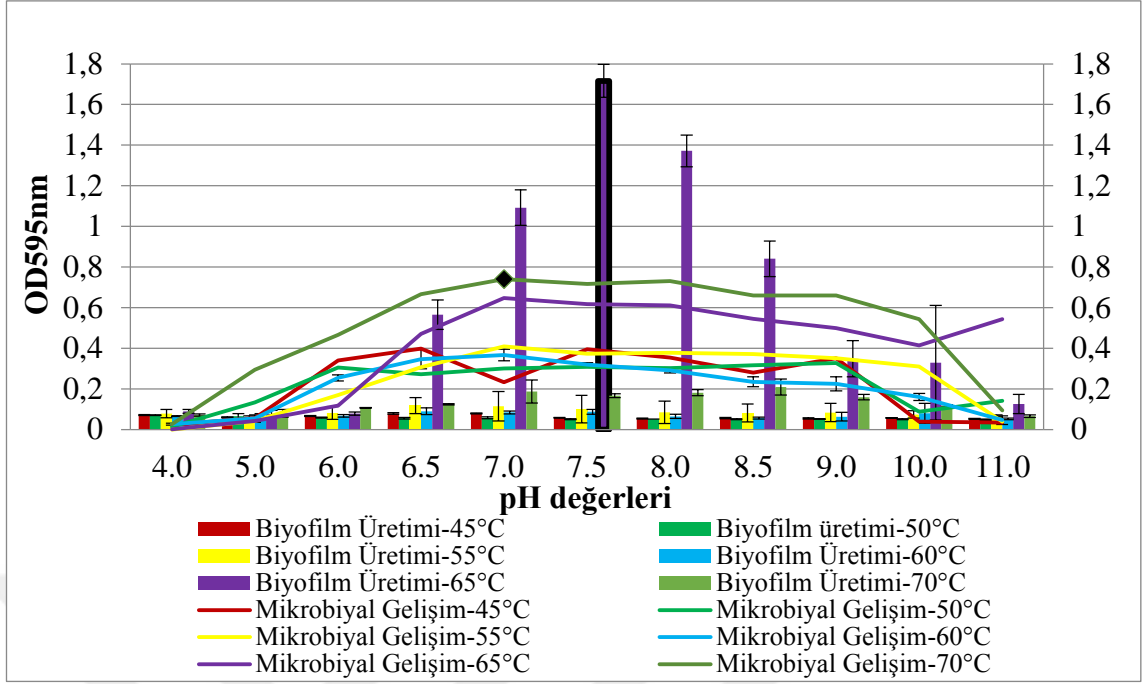
Çizelge 4.29 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermoglucosidans* B84a)

<i>G. thermoglucosidans</i> B84a					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	25,626	,000	Model	79,682	,000
Intercept	2.072,042	,000	Intercept	2.499,511	,000
pH	30,351	,000	pH	204,048	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	75,103	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	245,617	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	19,733	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	38,216	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (M. gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 6,5 (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			pH 6,5-7,5 (Belirtilen değerler azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
55 °C (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			55 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değer).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,302 -Zayıf korelasyon					

Çizelge 4.30 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*G. thermoglucosidans* B84a)

		<i>G. thermoglucosidans</i> B84a											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 7,5 (% 0,5 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 55 °C-pH 6,5 (% 0,5 NaCl)													

G. thermoglucosidans B84a izolatu için en ideal biyofilm üretim koşulu 55 °C'de asidik pH'da saptanmıştır (pH 6,5), (Şekil 4.25). Bu izolatta biyofilm üretimi oldukça dar bir skalada gözlenmiştir (Çizelge 4.30).



Şekil 4.26 *G. thermodenitrificans* D195 izolatının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

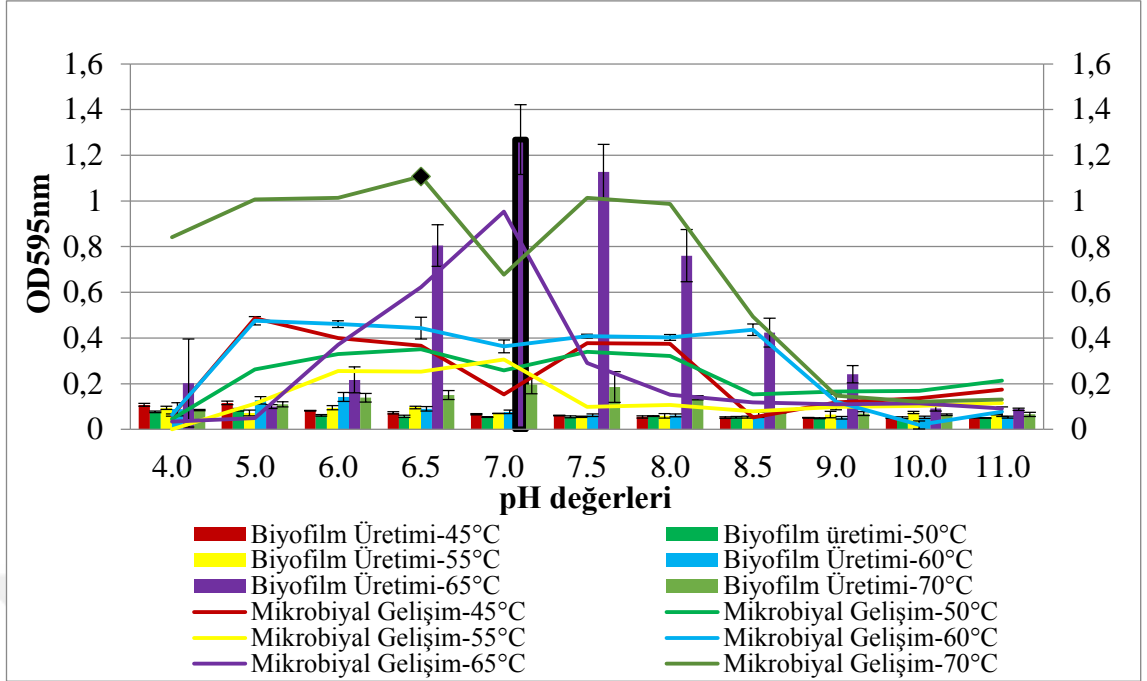
Çizelge 4.31 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. thermodenitrificans* D195)

<i>G. thermodenitrificans</i> D195					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	26,933	,000	Model	24,994	,000
Intercept	1.137,572	,000	Intercept	1.208,179	,000
pH	34,400	,000	pH	65,587	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	142,032	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	65,933	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	13,930	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	12,781	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (M. gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 7,5 (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			pH 7,0 ve 7,5 (Belirtilen değerler azami mikrobiyel gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
65 °C (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değerdir).			70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklığı değeri azami mikrobiyel gelişimin gerçekleştiği değer).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,434 -Orta şiddette korelasyon					

Çizelge 4.32 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*G. thermodenitrificans* D195)

		<i>G. thermodenitrificans</i> D195											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 7,0 (% 0,5 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 65 °C-pH 7,5 (% 0,5 NaCl)													

G. thermodenitrificans D195 izolatında ideal biyofilm üretimine yüksek inkübasyon sıcaklığında rastlanmıştır (65 °C, pH 7,5), (Şekil 4.26). Bu izolatta geniş skalada asidik ve alkali pH'da mikrobiyal gelişim gözlenirken, biyofilm üretimi görece daha dar bir skalada gözlenmiştir (Çizelge 4.32).



Şekil 4.27 *G. vulcanii* DSM 13174T referans suşunun farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki biyofilm üretim ve mikrobiyal gelişim miktarları

Siyah çerçeveli sütun azami biyofilm üretim koşuluna; çizgisel grafiklerdeki siyah işaretleyici ise azami mikrobiyal gelişim koşuluna karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.33 Besiyeri pH'sının altı farklı inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi ve mikrobiyal gelişim üzerine olan etkileri (*G. vulcanii* DSM 13174^T)

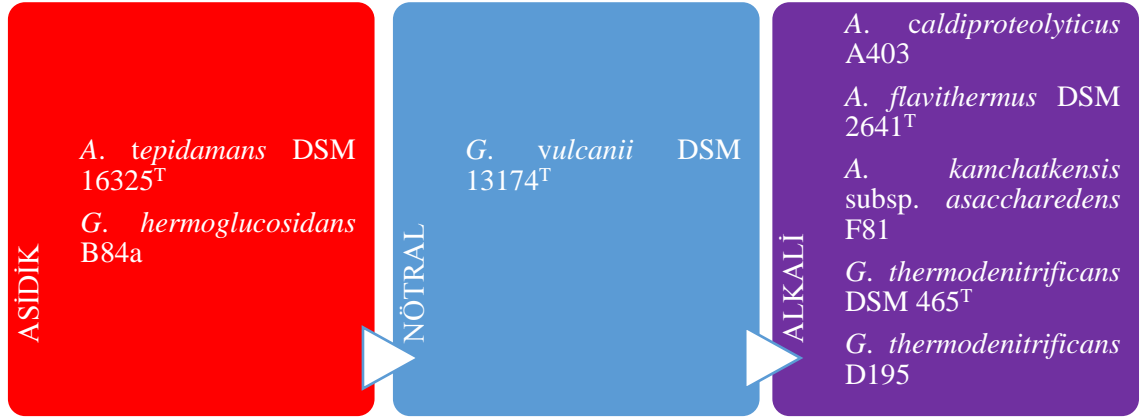
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T					
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Univariate Analizi (Mikrobiyal Gelişim) p<0,05		
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	Bağımlı değişkenler	F	Sig.
Model	19,856	,000	Model	11,393	,000
Intercept	780,329	,000	Intercept	1.492,174	,000
pH	17,904	,000	pH	43,627	,000
İnkübasyon Sıcaklıkları	106,895	,000	İnkübasyon Sıcaklıkları	34,194	,000
pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	11,542	,000	pH *İnkübasyon Sıcaklıkları	2,667	,000
Tukey Testi (Biyofilm, İdeal pH değerleri) p<0,05			Tukey Testi (M. gelişim, İdeal pH değerleri) p<0,05		
pH 7,5 (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değeridir).			pH 6,5-8,0 (Belirtilen değerler azami mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği değerler olup, değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir).		
Tukey Testi (Biyofilm Üretimi, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05			Tukey Testi (Mikrobiyal gelişim, İdeal inkübasyon sıcaklıkları) p<0,05		
65 °C (Belirtilen pH değeri azami biyofilm üretiminin gerçekleştiği değeridir).			65 °C, 70 °C (Belirtilen inkübasyon sıcaklık değerleri azami mikrobiyel gelişimin gerçekleştiği değerlerdir).		
Biyofilm Üretimi-Mikrobiyal Gelişim Korelasyonu (Korelasyon Katsayısı-Yorumu)					
0,309 -Zayıf korelasyon					

Çizelge 4.34 Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim/biyofilm üretim karakteristikleri (*G.vulcanii* DSM 13174^T)

		<i>G.vulcanii</i> DSM 13174 ^T											
		pH Skalası											
		4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0	11,0
Mikrobiyal Gelişim	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal mikrobiyal gelişim koşulu; 70 °C-pH 6,5 (% 0,5 NaCl)													
Biyofilm	45 °C												
	50 °C												
	55 °C												
	60 °C												
	65 °C												
	70 °C												
En ideal biyofilm üretim koşulu; 65 °C-pH 7,0 (% 0,0 NaCl)													

G.vulcanii DSM 13174^T refeans suşunda çok düşük pH değerlerinde dahi mikrobiyal gelişim saptanmıştır (pH 4,0). Bu suşun ideal biyofilm koşulu olarak da 65 °C inkübasyon sıcaklığı ve nötral pH değeri saptanmıştır (pH 7,0), (Şekil 4.27).

Geobacillus cinsi üyeleri (*G. glucosidans* B84a izolatu hariç) yüksek sıcaklıklarda (65 °C ve 70 °C) güçlü bir biyofilm üretimi sergilemektedir. pH ve sıcaklık değerlerinin biyofilm üretimine olan etkileri genel olarak değerlendirildiğinde *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin daha geniş bir pH ve sıcaklık skalasında biyofilm üretebildiği görülmektedir. Her iki cinsin üyeleri de genel olarak alkali pH'da biyofilm üretim eğilimi göstermektedir (Şekil 4.28).

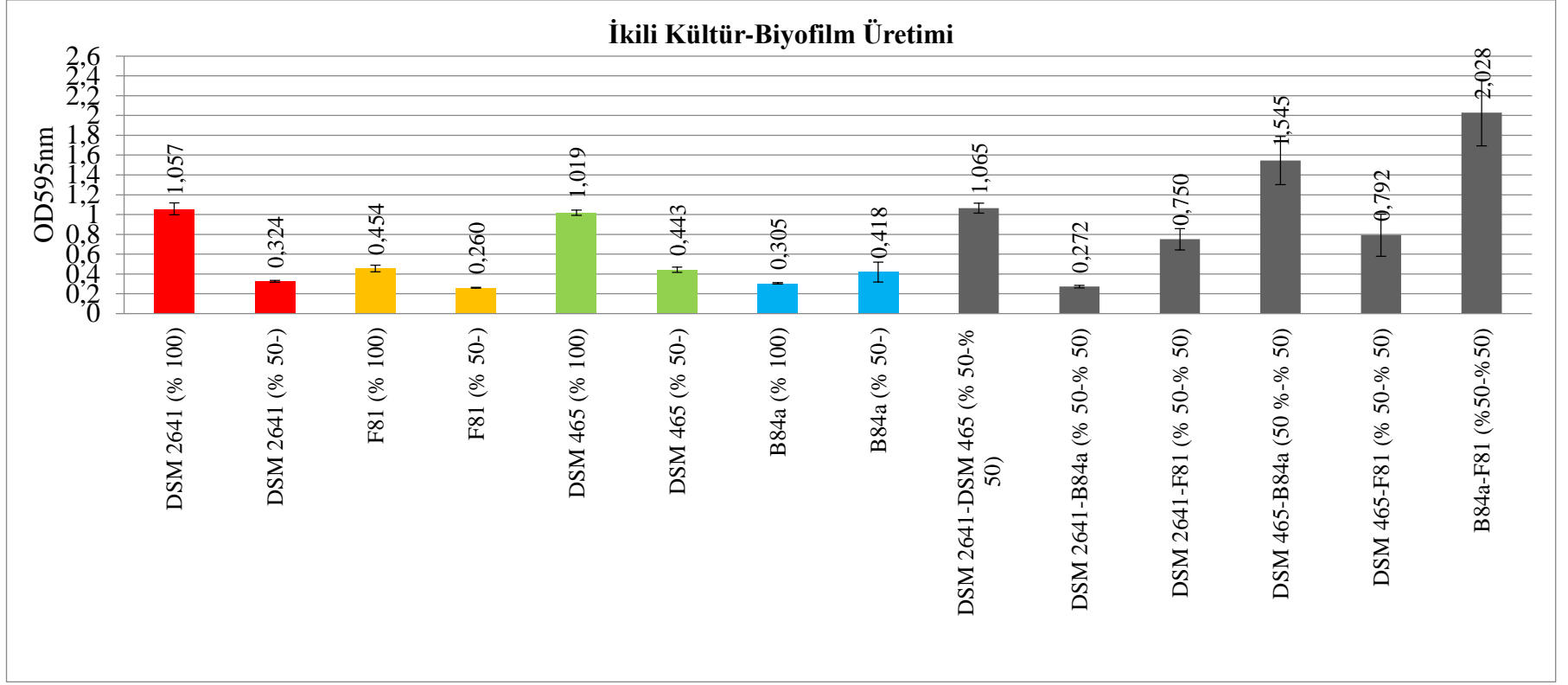


Şekil 4.28 Seçilen 8 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine üye bakterilerin pH gereksinimlerine göre ideal düzeyde biyofilm üretebildiği koşullar

4.6 Kompleks biyofilm sistemleri içerisinde *Geobacillus*/*Anoxybacillus* cinsi bakterilerin etkileşimlerinin araştırılması

Çalışma dört termofilik bakteri için de mümkün mertebe ideal olan inkübasyon koşulları alınarak yürütülmüştür [pH 7,0, 60 °C, standart TSB (% 0,5 NaCl katkı)]. Her bir bakterinin tek tek ve olası tüm ikili kültür kombinasyonları denenerak, dört bakterinin ortak bir biyofilm sistemi içerisindeyken görece ne düzeyde toplam biyofilm üretimine katkıda buldukları saptanmıştır.

A. flavithermus DSM 2641^T referans suşu ile *G. thermoglucosidans* B84a izolatının ikili kültürü dışında, tüm ikili *Anoxybacillus*-*Geobacillus* ikili kültür kombinasyonlarında toplam biyofilm üretim kapasitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır (Tek Yönlü Varyans Analizi, $p < 0,05$), (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Terfomilik basillerin tekli kültürlerinin ve farklı olası kombinasyonlar ile hazırlanan ikili kültürlerin biyofilm üretiminin belirlenmesi

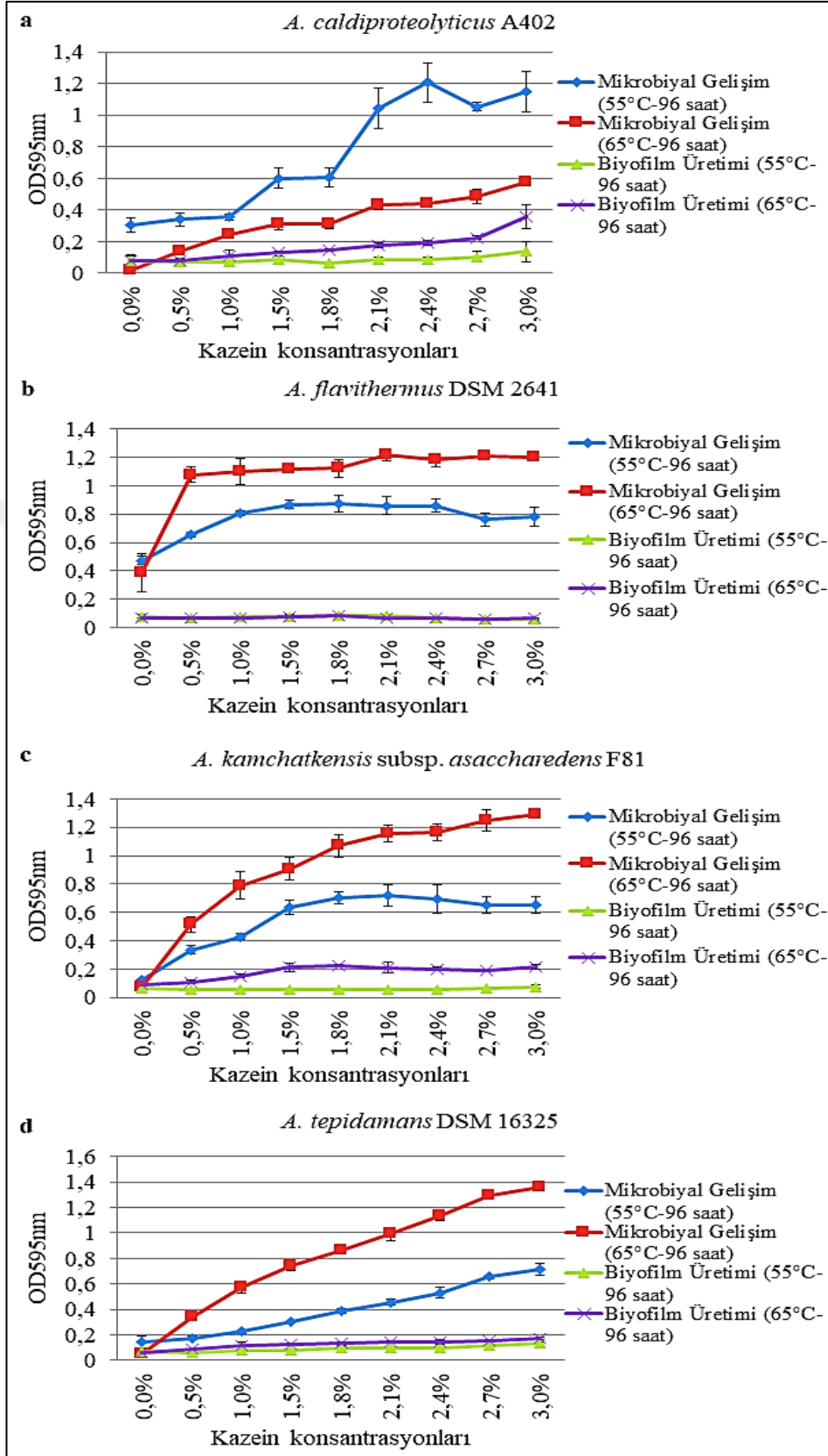
4.7 Major (kazein-laktoz) ve minör (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) süt bileşenlerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması

Bu aşamada ilk etapta biyofilm üretimi için çalışılan bakterilerin gereksinim duyacağı temel çevresel parametlerinden (pH, tuzluluk, sıcaklık) farklı olarak süt içeriğini yansıtacak mahiyette major ve minör süt bileşenlerindeki değişimlerin biyofilm üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Mevcut süt bileşenlerinin biyofilm üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilirken, süt bileşenlerinin Bazal Medium besiyerine ilavesi sonucu söz konusu durumda neden olabileceği olası riskler termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerine olan etkileri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmalar yine iki kritik inkübasyon sıcaklığında (55 °C ve 65 °C) ve polistiren yüzeylerde yürütülmüştür.

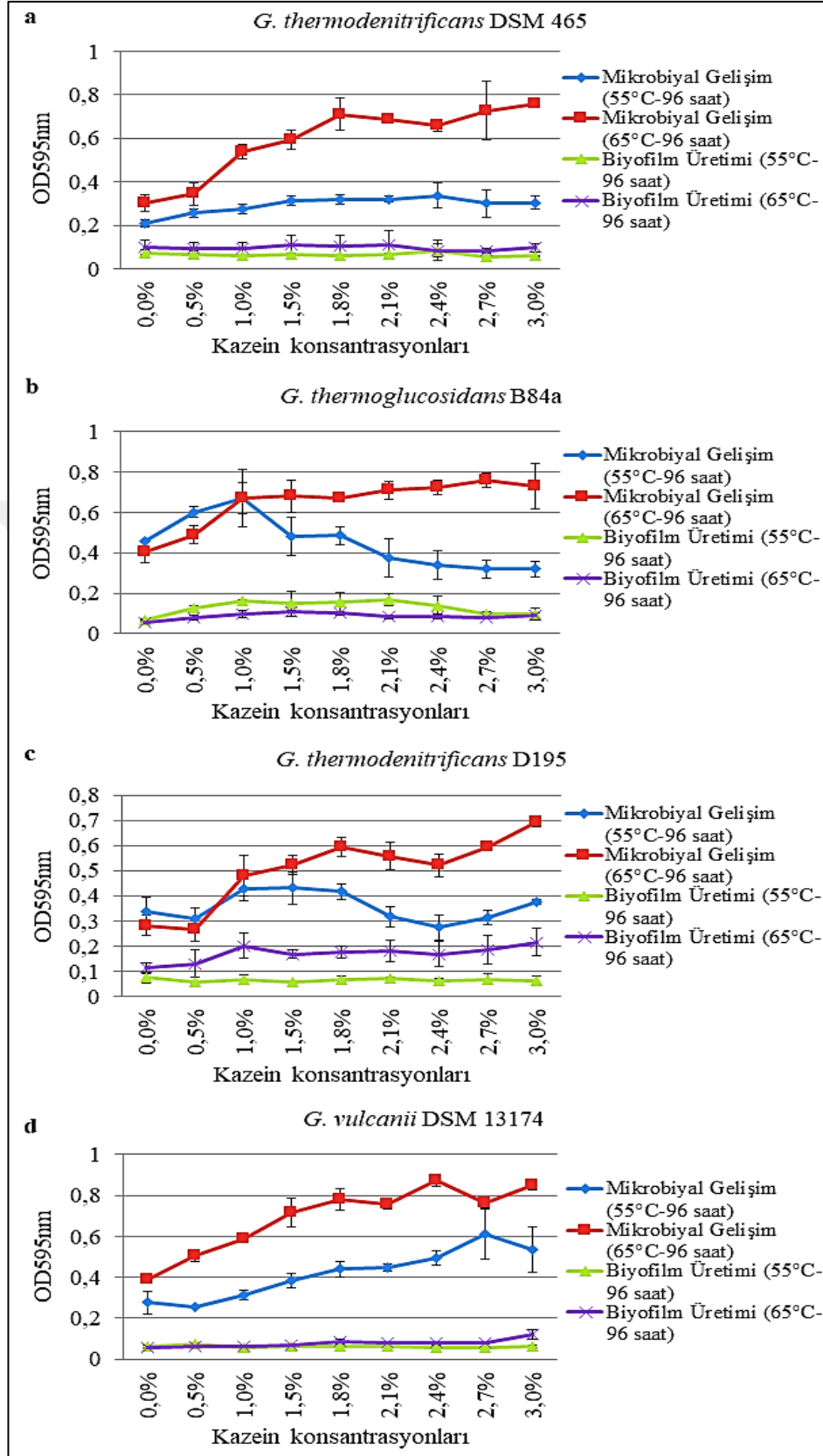
4.7.1 Kazeinin termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

A. caldiproteolyticus A403 izolatında her iki sıcaklıkta da artan kazein miktarı mikrobiyal gelişimi teşvik ederken, biyofilm üretimindeki teşvik çalışılan en yüksek kazein konsantrasyonunda (% 3,0) görülmüştür (Tukey Testi, $p<0,05$), (Şekil 4.30.a). *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunda kazein konsantrasyonundaki hafif artış (% 0,5) mikrobiyal gelişimi teşvik etmeye kafi gelmiştir. % 0,5-% 3,0 konsantrasyonlarının mikrobiyal üretime olan artışıdaki etkileri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Tukey testi, $p<0,05$). Kazeinin bu referans suşun biyofilm üretimine bir katkı sağladığı görülmemiştir (Şekil 4.30.b). *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında 65 °C’de kazeindeki her konsantrasyon artışı mikrobiyal gelişimi artırırken, 55 °C’de % 1,5-% 3,0 kazein konsantrasyonlarının mikrobiyal üretime olan katkıları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tukey testi, $p<0,05$). Kazein konsantrasyonundaki artış biyofilm üretiminde hafif bir artışa neden olmuştur (65 °C, istatistiksel açıdan anlamlı değildir), (Şekil 4.30.c). *A. tepidamans* DSM 16325^T suşunda kazein konsantrasyonlarındaki artış her iki inkübasyon sıcaklığında mikrobiyal gelişimi teşvik ederken, biyofilm üretimi üzerinde bir etki sağlamamıştır (Şekil 4.30.d). *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunda 65 °C’de kazein artışı mikrobiyal gelişimi teşvik ederken, 55 °C’de mikrobiyal gelişimde herhangi bir etki göstermemiştir. Kazeinin yine bu suşun biyofilm üretimine müspet bir katkısı olmamıştır (Şekil 4.31.a).

G. thermoglucosidans B84a izolatında 65°C’de artan kazein konsantrasyonu mikrobiyal gelişime katkı sağlarken (% 1,0-1,5-1,8-2,1-2,4-2,7-3,0 grupları arasındaki fark anlamlı değil Tukey testi, $p<0,05$), 55 °C’de artan kazein konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi inhibe etmiştir (Şekil 4.31.b). *G. thermodenitrificans* D195 izolatında 65 °C’de artan kazein konsantrasyonu mikrobiyal gelişime katkı sağlarken (% 1,0-1,5-1,8-2,1-2,4 grupları arasındaki fark anlamlı değil Tukey testi, $p<0,05$), 55 °C’de değişen kazein konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi etkilememiştir (konsantrasyonlar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır Tukey testi, $p<0,05$). 65 °C’deki biyofilm üretiminde % 1,0 ve üzeri kazein konsantrasyonlarında kayda değer bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.31.c). *G.vulcanii* DSM 13174^T suşunda her iki inkübasyon sıcaklığında artan kazein konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi teşvik ederken, biyofilm üretimi üzerinde müspet bir etki göstermemiştir (Şekil 4.31.d).



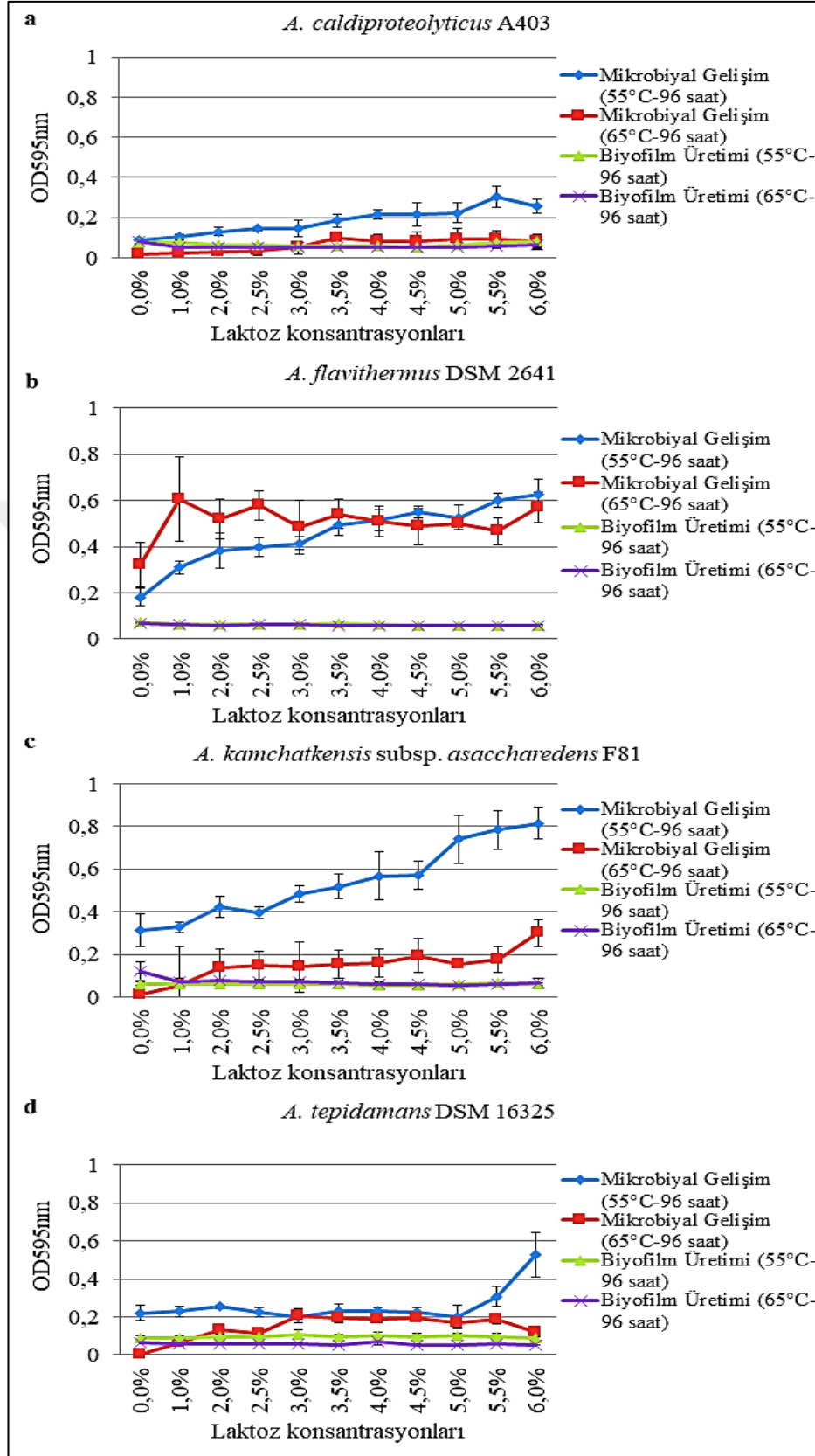
Şekil 4.30 Kazeinin *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



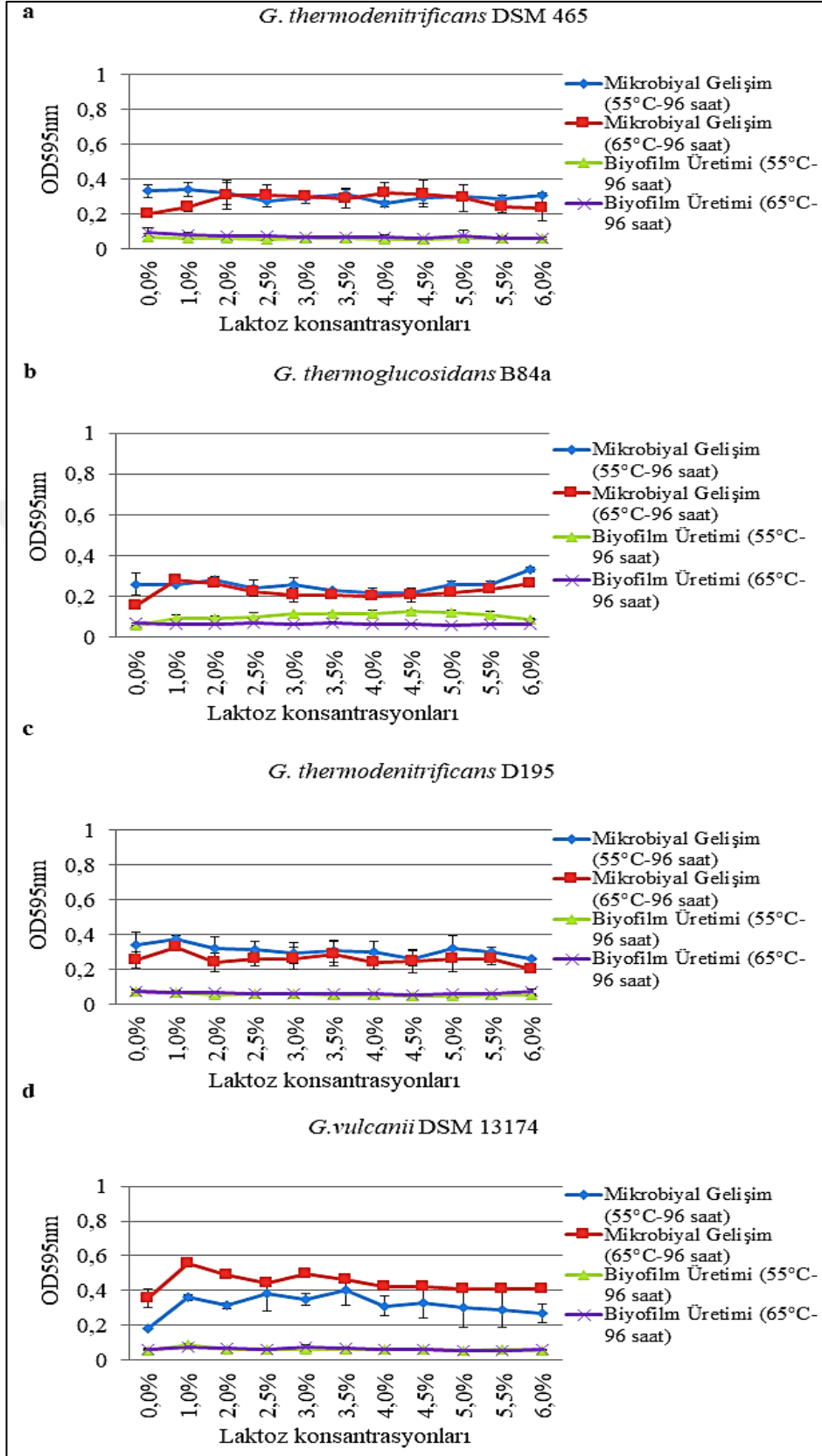
Şekil 4.31 Kazeinin *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

4.7.2 Laktozun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

Farklı laktoz konsantrasyonlarının *A. caldiproteolyticus* A403 izolatın gerek mikrobiyal gelişimi gerekse biyofilm üretimi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.32.a). *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunda 55 °C’de laktoz konsantrasyonundaki artış mikrobiyal gelişim üzerinde müspet bir etki gösterirken, 65 °C’de % 1’lik laktoz içeriği mikrobiyal gelişim üzerinde anlamlı bir etki göstermiştir (Tukey Testi, p<0,05). Bu suшта laktozun biyofilm üretimi üzerinde önemli bir etkisi saptanmamıştır (Şekil 4.32.b). *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında laktozun tek anlamlı etkisi 55 °C’de mikrobiyal gelişim üzerinde olmuştur (Şekil 4.32.c). *A. tepidamans* DSM 16325^T suşunda yalnızca yüksek konsantrasyonda laktoz içeriğinde (% 5,5 ve % 6,0) 55 °C’de mikrobiyal gelişim üzerinde kayda değer sonuçlar elde edilmiştir (Tukey Testi, p<0,05) (Şekil 4.32.d). *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunda laktozun ne mikrobiyal gelişim ne de biyofilm üretimi üzerinde bir etkisi saptanmıştır (Şekil 4.33.a). *G. thermoglucosidans* B84a izolatında laktoz yüksek konsantrasyonlarda yalnızca mikrobiyal gelişim üzerinde düşük düzeyde bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.33b). *G. thermodenitrificans* D195 izolatında laktozun herhangi bir etkisi saptanmamıştır (Şekil 4.33c). *G. vulcanii* DSM 13174^T suşunda düşük konsantrasyonlu laktoz içeriği (% 1,0) mikrobiyal gelişim üzerinde anlamlı bir artış sağlamıştır (Şekil 4.33.d). Besiyeri içeriğine farklı konsantrasyonlarda laktoz ilavesi yalnızca laktozu fermente edebilen (*A. caldiproteolyticus*, *A. flavithermus*, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*, *G. vulcanii*) izolat ve referans suşların mikrobiyal gelişimini olumlu yönde etkilerken, biyofilm üretimini kayda değer düzeyde etkilememiştir.



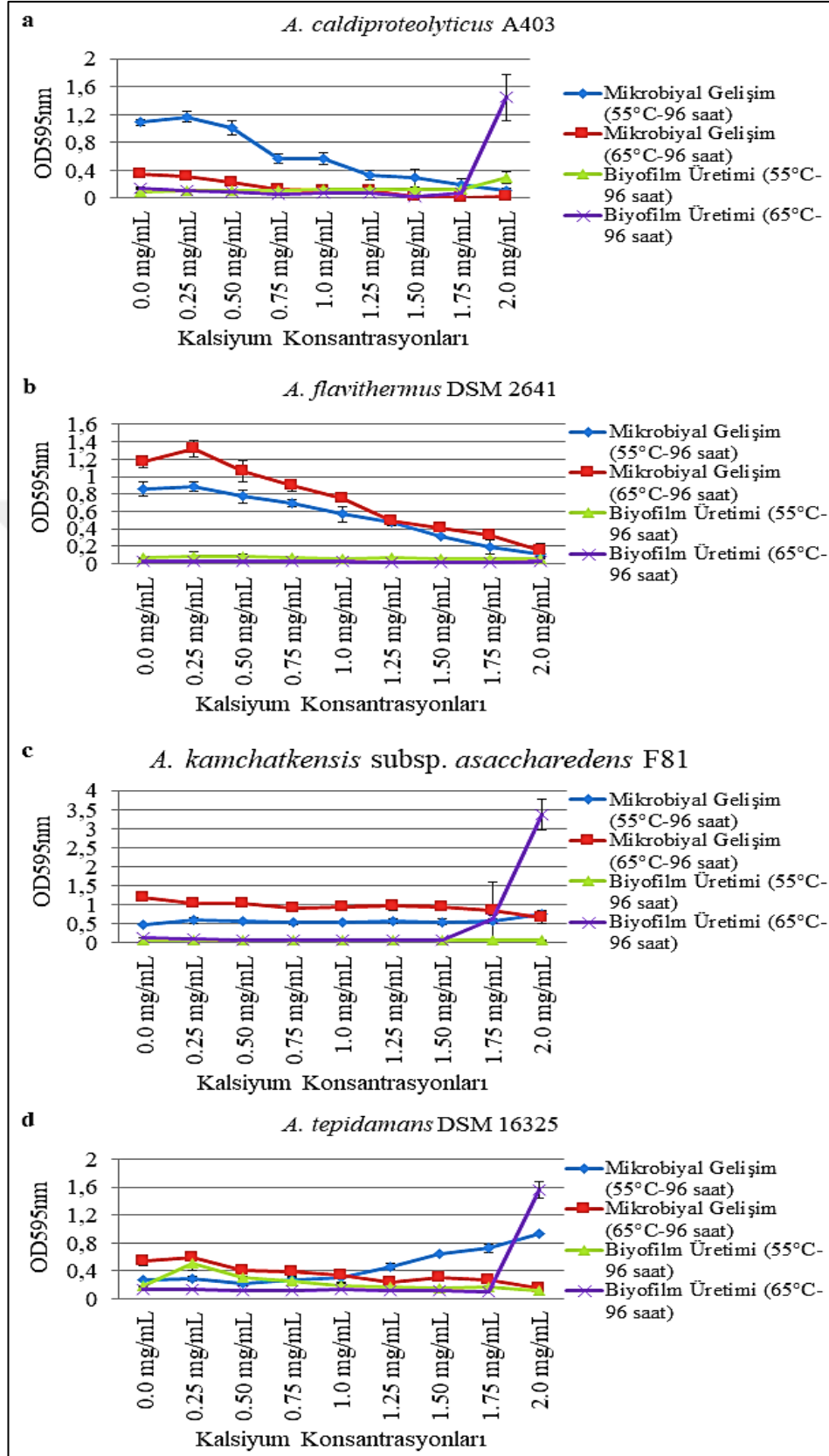
Şekil 4.32 Laktozun *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



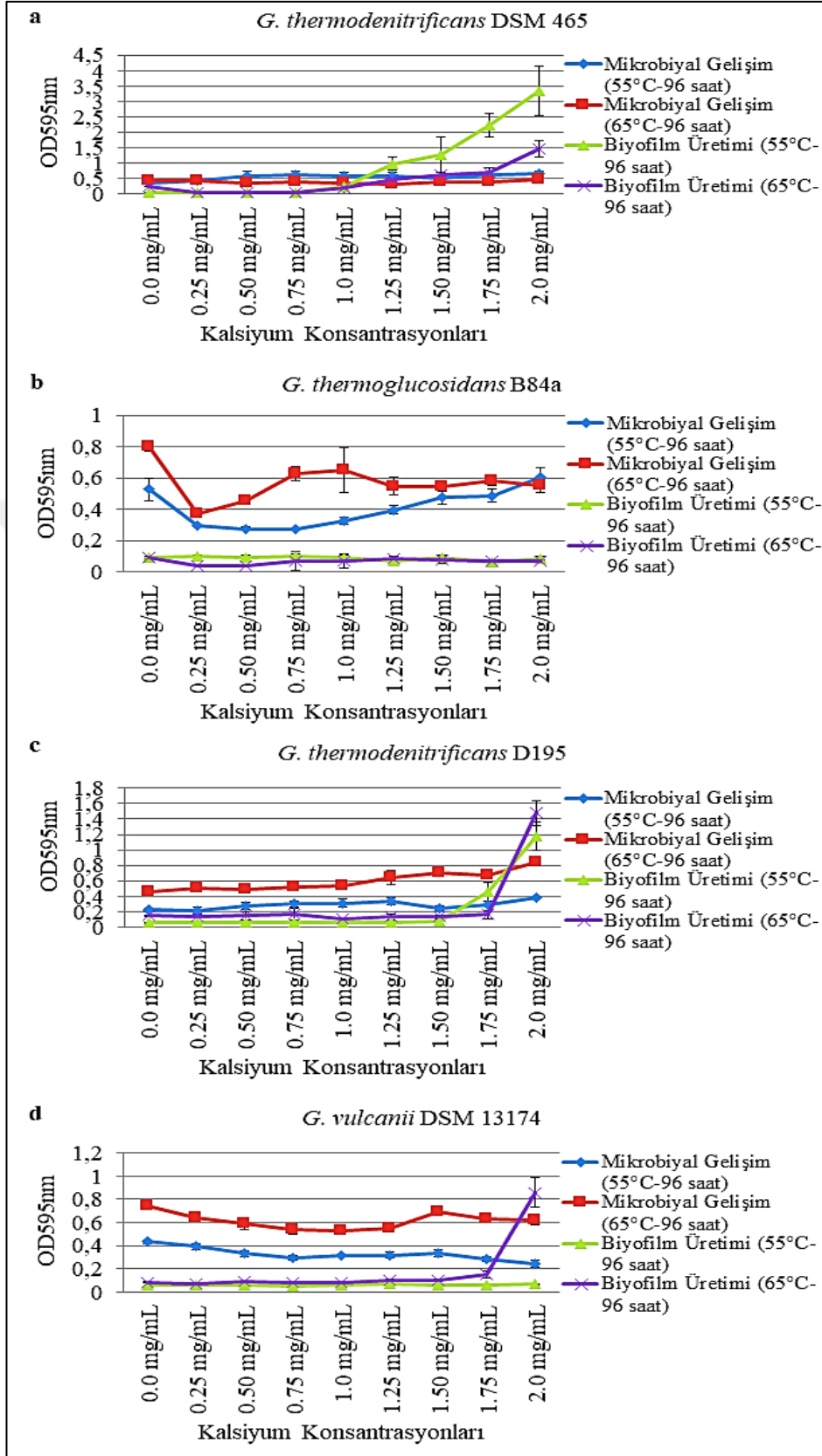
Şekil 4.33 Laktozun *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

4.7.3 Kalsiyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

Anoxybacillus izolat ve referanslarında artan kalsiyum konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi inhibe edecek mahiyette etki gösterirken, *A. flavithermus* DSM 2641^T suşu hariç diğer tüm *Anoxybacillus* üyelerinde yüksek kalsiyum konsantrasyonu (1,75-2,0 mg/mL) biyofilm üretimini ciddi ölçüde teşvik etmiştir. Ancak belirtilen kalsiyum konsantrasyonu sıklıkla tüketime sunulan standart inek sütünün içerdiği ortalama kalsiyum içeriğinden yüksektir (1,0-1,5 mg/mL). 1,75 mg/mL üzerindeki kalsiyum konsantrasyonları ilgili bakterilerin biyofilm üretimleri açısından kritik bir eşiğe işaret etmektedir (Şekil 4.34). *G. thermoglucosidans* B84a izolatı dışındaki tüm *Geobacillus* üyelerinde artan kalsiyum konsantrasyonları biyofilm üretimi teşvik edecek mahiyettedir. *Anoxybacillus* üyelerindekinden farklı olmayacak şekilde biyofilm üretiminin teşvik edilmesi için gereken konsantrasyon eşiği bu grubun üyelerinde de aynı bulunmuştur (1,75 mg/mL). Söz konusu durum bu bileşen açısından hem *Anoxybacillus* hem de *Geobacillus* cinsi üyelerinin biyofilm üretimleri itibariyle benzer riskler doğurabileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.35), (Tukey Testi, $p < 0,05$).



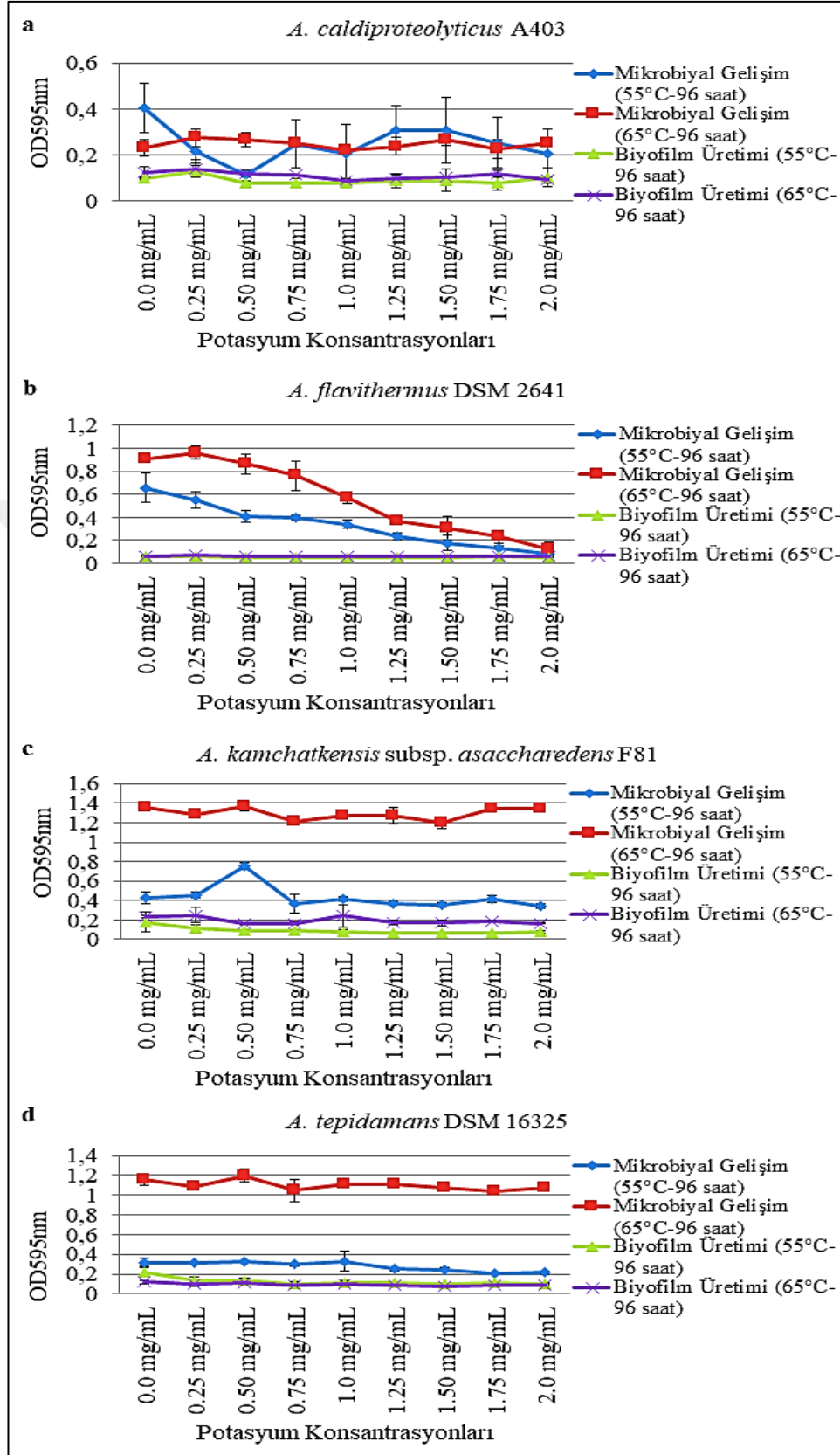
Şekil 4.34 Kalsiyumun *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



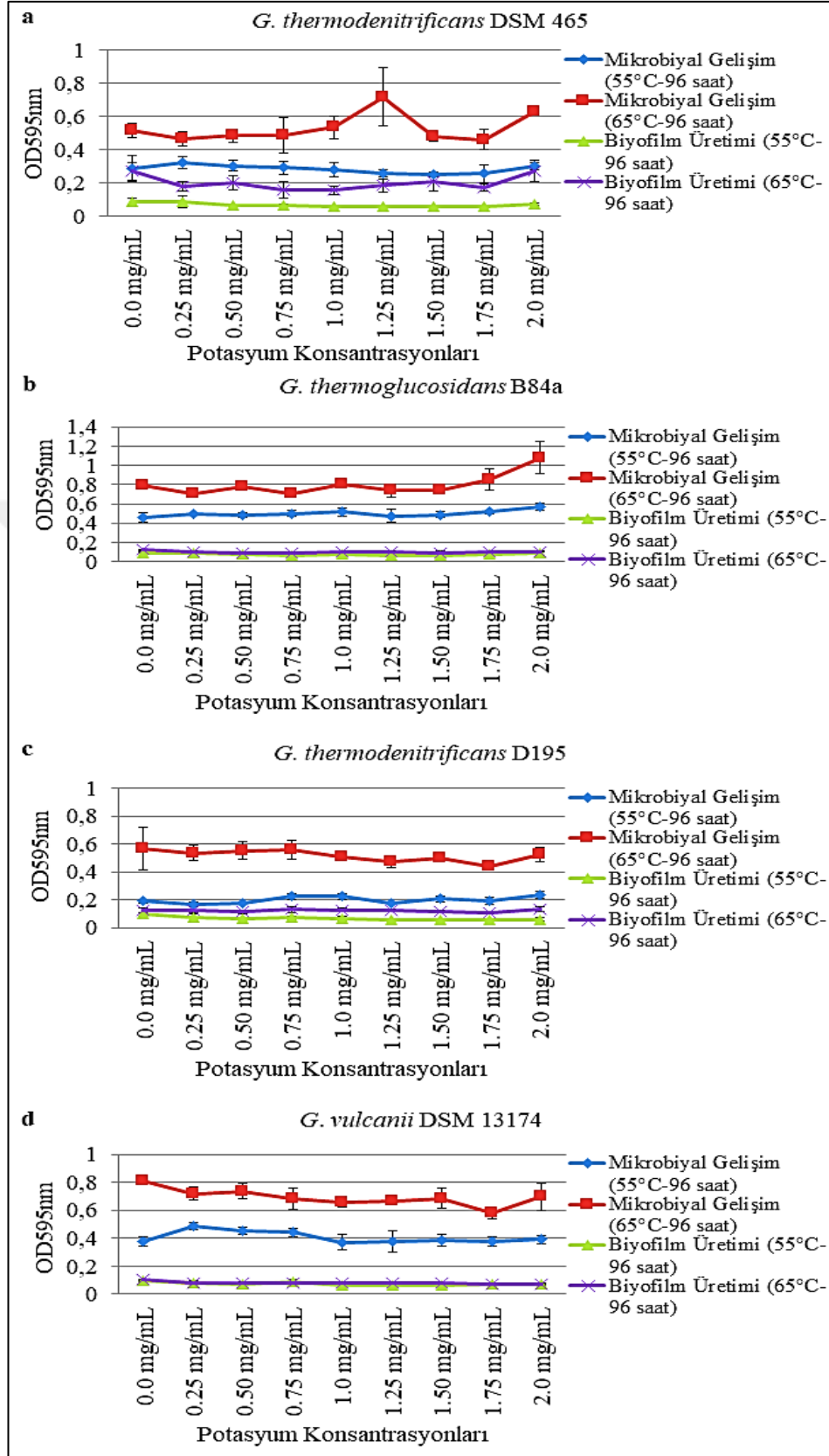
Şekil 4.35 Kalsiyumun *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

4.7.4 Potasyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

Artan K^+ konsantrasyonları, *A. flavithermus* DSM 2641^T suşu haricinde *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin gerek mikrobiyal gerekse biyofilm üretimleri üzerinde kayda değer bir etki göstermemiştir. Belirtilen suşta artan potasyum konsantrasyonları mikrobiyal gelişim üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir (Şekil 4.36). Artan K^+ konsantrasyonları, *G. thermoglucosidans* B84a izolatu haricinde *Geobacillus* cinsi üyelerinin gerek mikrobiyal gerekse biyofilm üretimleri üzerinde kayda değer bir etki göstermemiştir. Belirtilen izolatta ise artan potasyum konsantrasyonları mikrobiyal gelişim üzerinde müspet bir etki göstermiştir (Şekil 4.37).



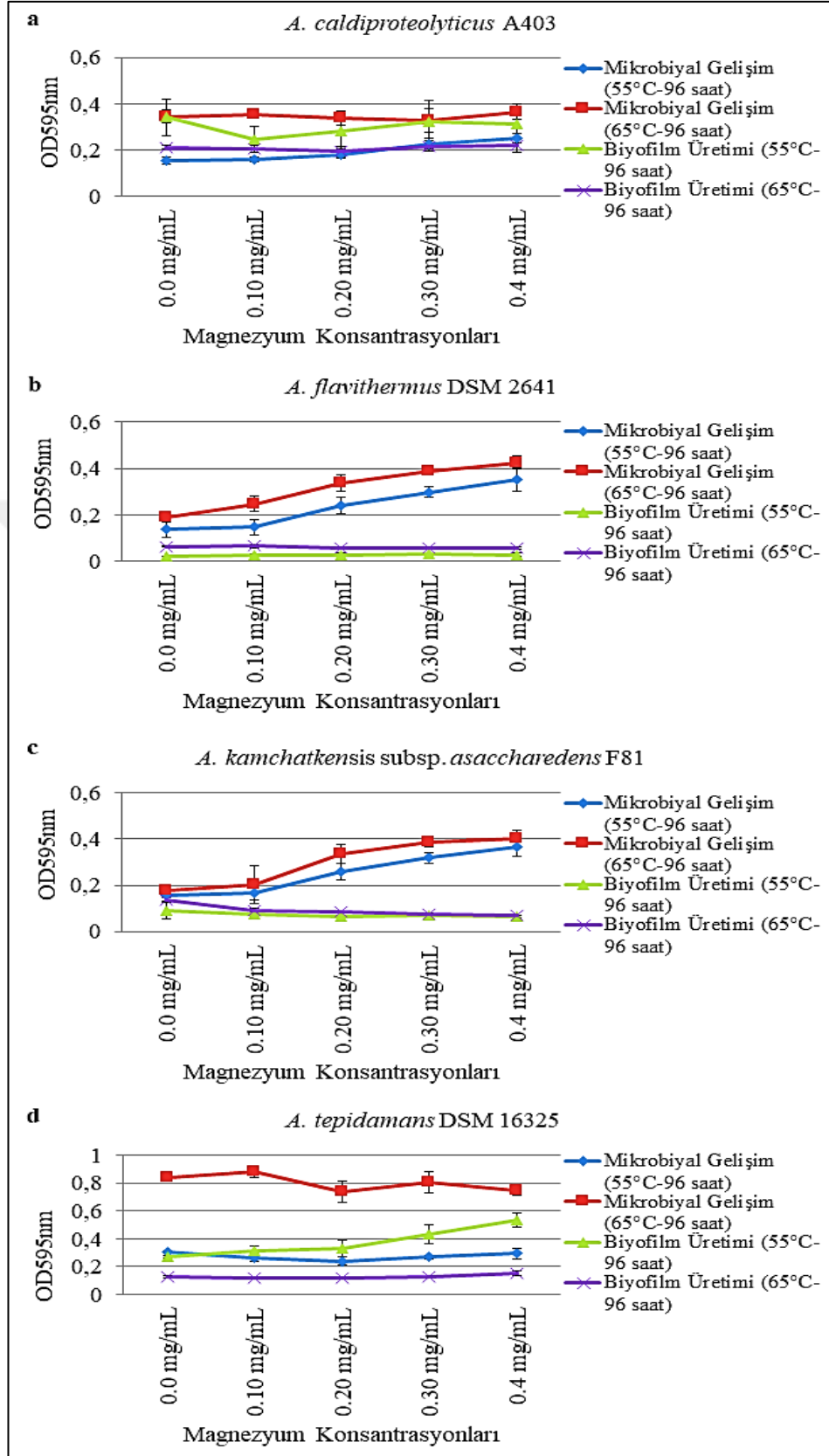
Şekil 4.36 Potasyumun *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



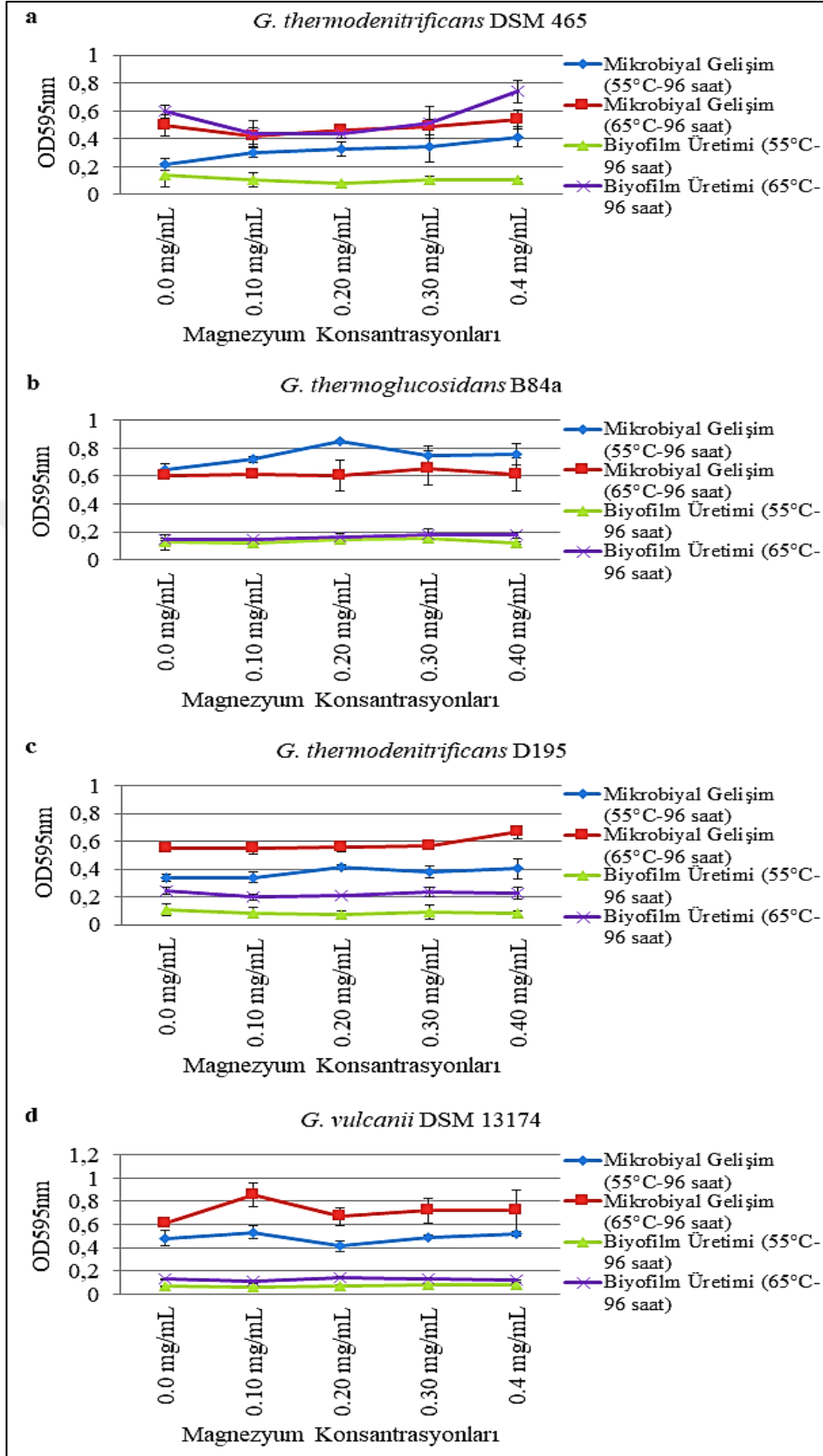
Şekil 4.37 Potasyumun *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

4.7.5 Magnezyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

A. flavithermus DSM 2641^T referans suşunda ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında artan magnezyum konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi teşvik etmiştir. Artan magnezyum konsantrasyonlarında biyofilm üretimindeki artış yalnızca *A. tepidamans* DSM 16325^T referans suşunda görülmüştür (Tukey Testi, $p<0,05$), (Şekil 4.38). Değişen magnezyum konsantrasyonlarının *Geobacillus* cinsi üyelerinin mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri üzerinde genel olarak bir etkisi saptanmazken, biyofilm üretiminde artış bir tek *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunda saptanmıştır (Tukey Testi, $p<0,05$) (Şekil 4.39).



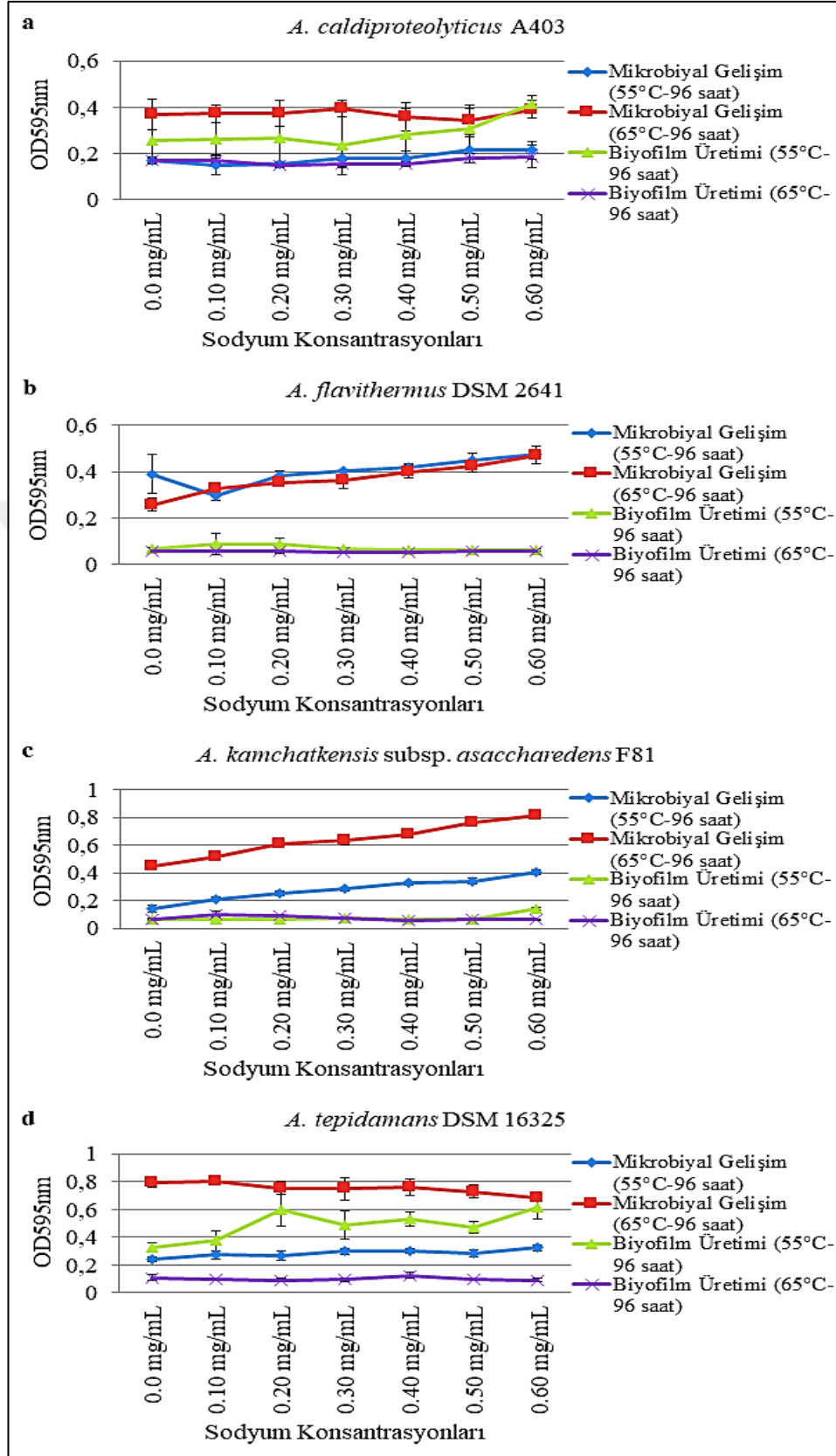
Şekil 4.38 Magnezyumun *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



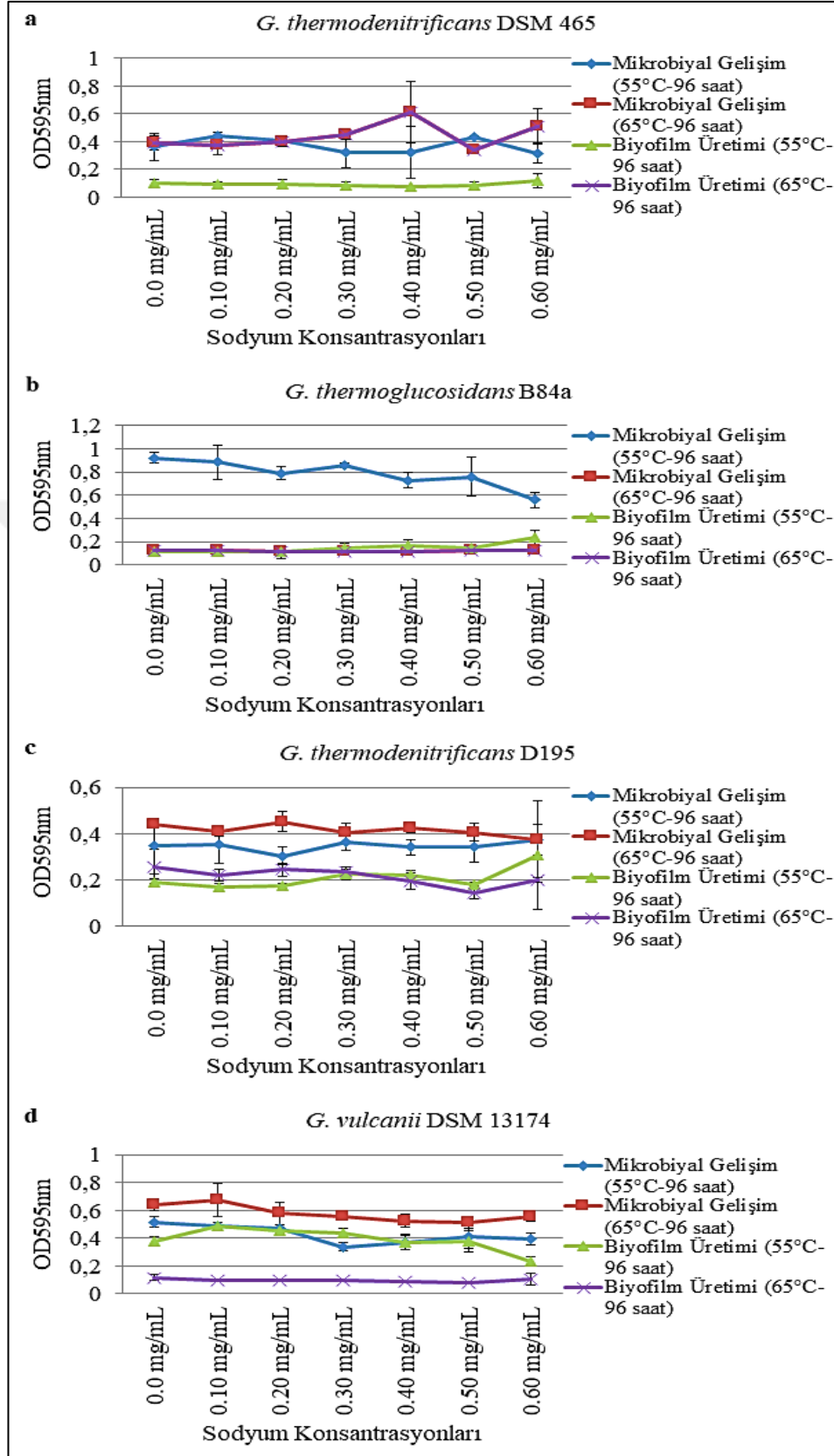
Şekil 4.39 Magnezyumun *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

4.7.6 Sodyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimi ve biyofilm üretimi üzerine olan etkileri

Tüm *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi üyelerinin biyofilm üretimleri için gereksinim duydukları Na⁺ gereksinimleri, daha öncesinde “biyofilm üretimleri için farklı NaCl konsantrasyonlarının etkileri” konulu çalışmadan elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir. Ancak standart süt tipleri içerisindeki sodyum konsantrasyonlarının daha önceki çalışma planında tercih edilen sodyum konsantrasyonlarının çok altında olmasına bağlı olarak, artan Na⁺ konsantrasyonlarında biyofilm üretiminde görülen çarpıcı artış bu çalışmadan elde edilen biyofilm üretim değerlerindeki artışın çok üzerindedir. Özetle standart süt tiplerinin içerisindeki ortalama Na⁺ konsantrasyonları biyofilm üretimi üzerinde olumsuz bir etki yaratmazken, bazı suş ve izolatların biyofilm üretimine belirgin bir katkı sağlamaktadır (Şekil 4.40 - 4.41).



Şekil 4.40 Sodyumun *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri



Şekil 4.41 Sodyumun *Geobacillus* izolatlarının ve referans suşlarının biyofilm üretimleri ve mikrobiyal gelişimleri üzerine olan etkileri

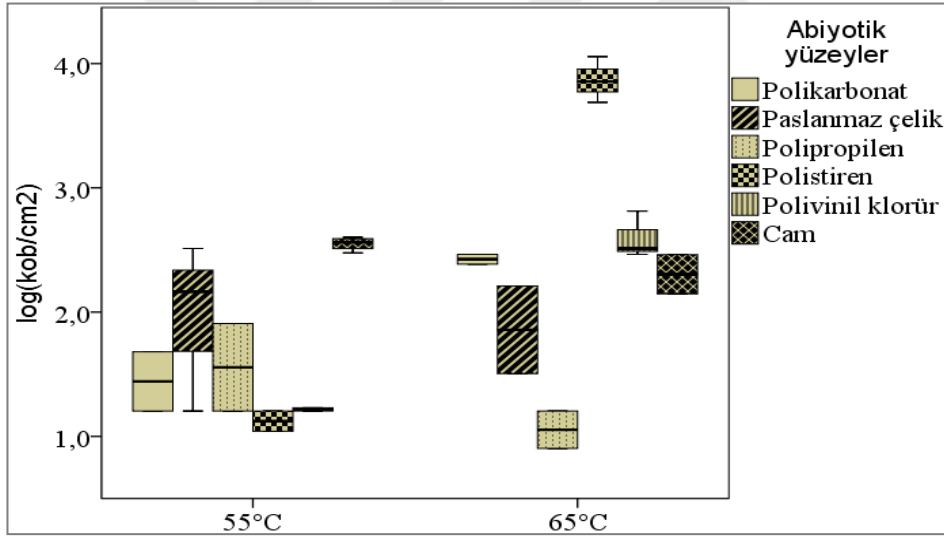
4.8 *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* Üyelerinin Süt Ortamındaki Farklı Abiyotik Yüzeylerde Biyofilm Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Geobacillus ve *Anoxybacillus* cinslerine üye toplam 8 bakterinin polikarbonat, polipropilen, polivinil klorür, paslanmaz çelik, polistiren ve cam tabiatında olan 6 farklı abiyotik yüzeyde, standart tam yağlı süt içeriğinde ve iki kritik inkübasyon sıcaklığında (55 °C ve 65 °C) ve 48 saat sonunda oluşturdukları biyofilmlerdeki koloni sayımlarının hücre yüzey alanlarına bölünmesiyle elde edilen oranlar ($\log(\text{kob}/\text{cm}^2)$) ile bu sonuçların istatistiksel analizleri, çizelge 4.35-4.44'te sunulmuştur. İstatistiksel analizler dahilinde hem yüzeylerin hem de inkübasyon sıcaklıklarının her bir izolat ve referans suşun biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri “Univariate” analizi ile saptanmıştır ($p<0,05$). Tüm bakteriler için her bir sıcaklıkta abiyotik yüzeylerin bakteriyal tutunma üzerindeki etkileri “Tukey Testi” ile kıyaslanmıştır ($p<0,05$). İstatistiksel sonuçların özetlendiği çizelgelerin yanı sıra farklı abiyotik yüzeylerdeki biyofilm üretim miktarları şekil 4.42-4.51'de verilmiştir.

Çizelge 4.35 *A. caldiproteolyticus* A403 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>A. caldiproteolyticus</i> A403			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Cam, Paslanmaz Çelik, Polipropilen, Polikarbonat* 2) Polivinil klorür, Polistiren*
Model	17,004	,000	
İntercept	1.112,484	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları	F	Sig.	Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	34,817	,000	1) Polistiren 2) Polivinil klorür, Polikarbonat, Cam* 3) Paslanmaz çelik, Polipropilen*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	18,226	,000	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



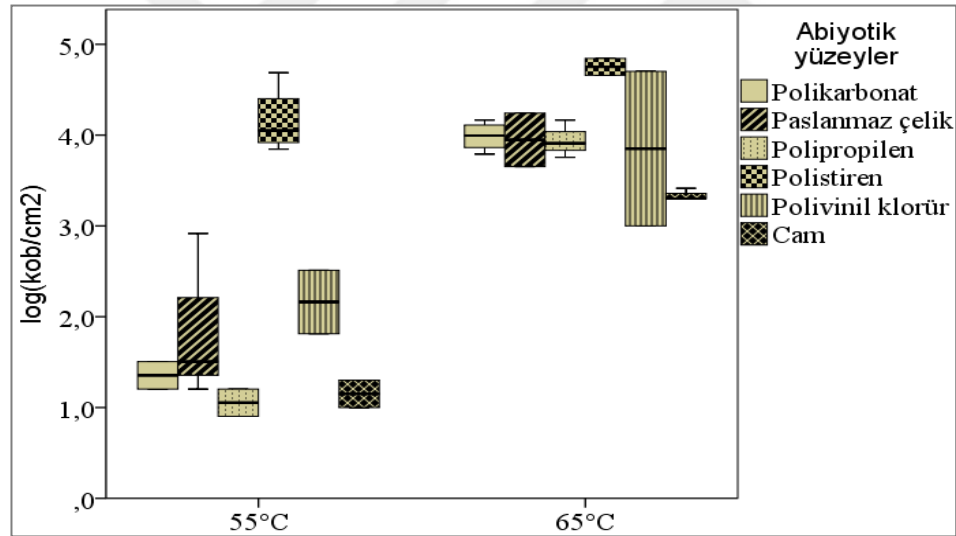
Şekil 4.42 *A. caldiproteolyticus* A403 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

A. caldiproteolyticus A403 izolatı tam yağlı süt içeriğinde 55 °C’de sırasıyla cam, paslanmaz çelik, polipropilen ve polikarbonat yüzeyler üzerinde biyofilm üretirken, 65 °C’de hidrofobik bir yüzey olan polistiren yüzeyde biyofilm üretmiştir (Çizelge 4.35, Şekil 4.42).

Çizelge 4.36 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Polistiren 2) Polivinil klorür, Paslanmaz çelik, Polikarbonat* 3) Cam, Polipropilen*
Model	18,711	,000	
İntercept	1.125,654	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları	14,098	,000	Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	129,464	,000	1) Polivinil klorür, Polistiren, Polikarbonat, Paslanmaz çelik, Polipropilen* 2) Cam
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	3,798	,015	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.

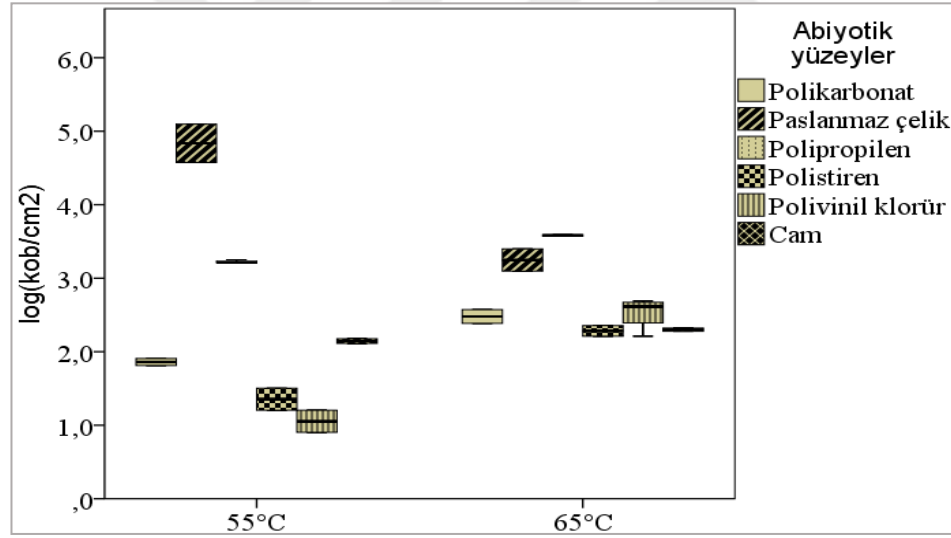


Şekil 4.43 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

A. flavithermus DSM 2641^T referans suşu tam yağlı süt içeriğinde 55 °C’de hidrofobik karakteristikte olan polistiren yüzey üzerinde biyofilm üretirken, 65 °C’de yine hidrofobik yüzeyler olan (paslanmaz çelik hariç) polivinil klorür, polistiren, polikarbonat ve polipropilen yüzeylerde biyofilm üretmiştir (Çizelge 4.36, Şekil 4.43).

Çizelge 4.37 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharadens* F81 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharadens</i> F81			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) $p < 0,05$			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,0555$ °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Paslanmaz çelik 2) Polipropilen 3) Polikarbonat, Cam* 4) Polistiren, Polivinil klorür*
Model	71,228	,000	
İntercept	5.639,845	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları	122,667	,000	Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	22,472	,000	1) Polipropilen, Paslanmaz çelik* 2) Polikarbonat, Polistiren* 3) Polivinil klorür, Cam*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	38,859	,000	
*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.			



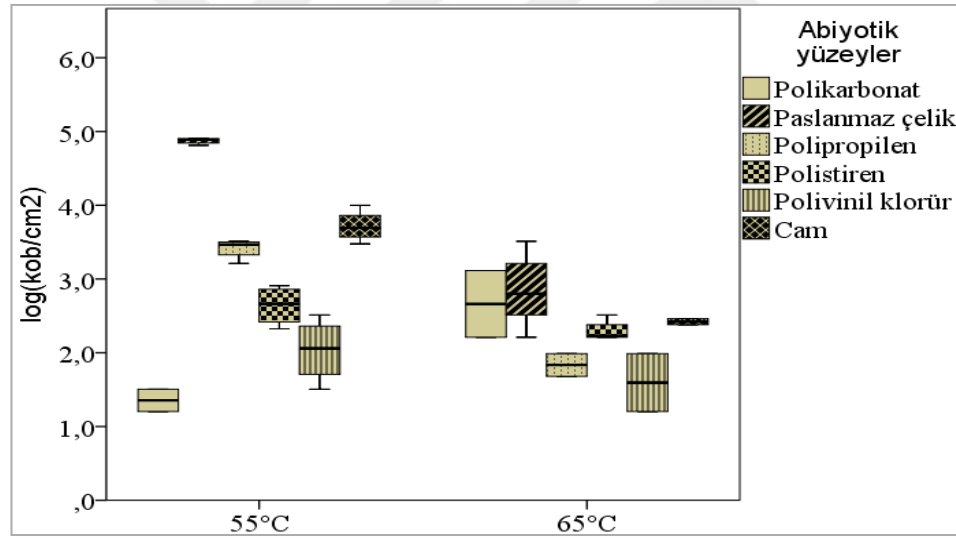
Şekil 4.44 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharadens* F81 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

A. kamchatkensis subsp. *asaccharadens* F81 izolatı 55 °C’de biyofilm üretimi için en çok, görece hidrofilik bir yüzey olan paslanmaz çelik yüzeyi tercih ederken, 65 °C’de hem hidrofilik (paslanmaz çelik) hem de hidrofobik yüzeyleri (polipropilen) tercih etmiştir (Çizelge 4.37, Şekil 4.44).

Çizelge 4.38 *A. tepidamans* DSM 16325^T standart suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Paslanmaz çelik 2) Cam, Polipropilen* 3) Polistiren 4) Polivinil klorür, Polikarbonat*
Model	30,030	,000	
Intercept	2.285,409	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	43,747	,000	1) Polikarbonat, Paslanmaz çelik, Cam, Polistiren, Polipropilen* 2) Cam
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	18,363	,000	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



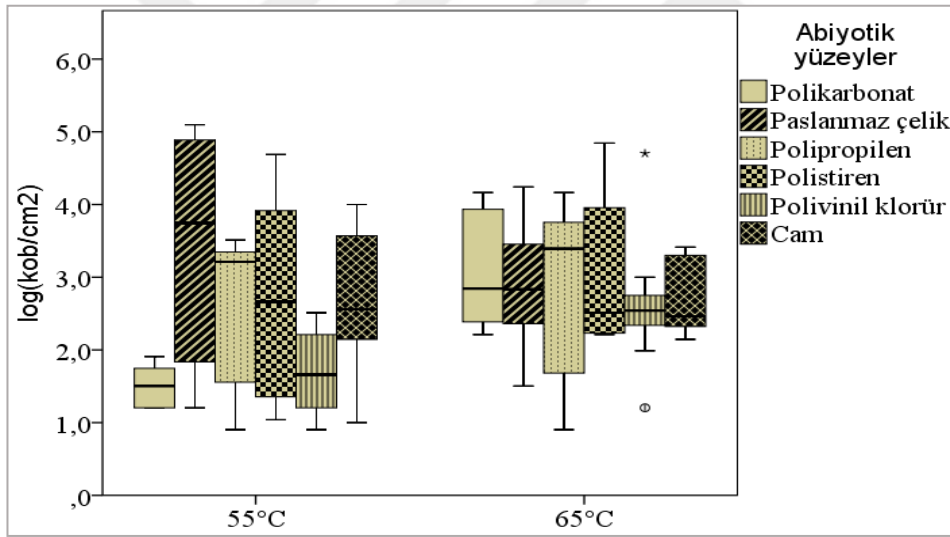
Şekil 4.45 *A. tepidamans* DSM 16325^T standart suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

A. tepidamans DSM 16325^T referans suşunun 55 °C’de ve 65 °C biyofilm üretimi için en çok tercih ettiği abiyotik yüzeyler sırasıyla paslanmaz çelik ve polikarbonat olmuştur (Çizelge 4.38, Şekil 4.45).

Çizelge 4.39 Tüm *Anoxybacillus* üyelerinin tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

Tüm <i>Anoxybacillus</i> üyeleri			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) $p < 0,05$			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Paslanmaz çelik, Polipropilen, Polistiren* 2) Cam, Polivinil klorür, Polikarbonat*
Model	2,892	,002	
Intercept	877,524	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	6,611	,011	1) Polipropilen, Polikarbonat, Paslanmaz çelik, Polivinil klorür, Polistiren, Cam*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	2,640	,027	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



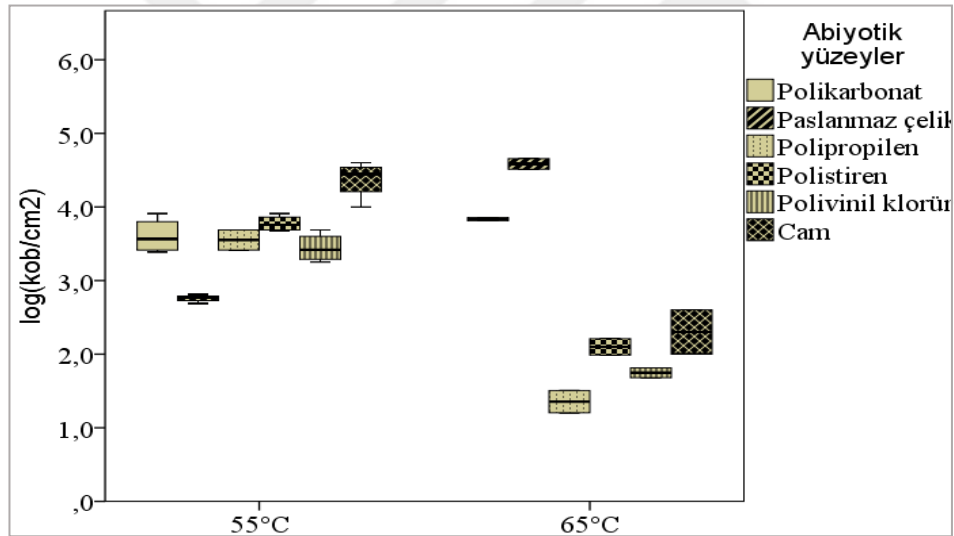
Şekil 4.46 Tüm *Anoxybacillus* üyelerinin standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

Tüm *Anoxybacillus* üyelerinin 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki tutunma ve biyofilm üretme yönelimleri değerlendirildiğinde bu cinsin 55 °C’de en çok tercih ettiği yüzeyler paslanmaz çelik, polipropilen ve polistiren olarak saptanırken; 65 °C’de ise tüm abiyotik yüzeyler üzerinde eşit düzeyde biyofilm üretme kabiliyetinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.39, Şekil 4.46).

Çizelge 4.40 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Cam 2) Polistiren, Polikarbonat, Polipropilen, Polivinil klorür* 3) Paslanmaz çelik
Model	2,555	63,462	
Intercept	289,809	7.197,181	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	6,457	160,355	1) Polikarbonat, Paslanmaz çelik* 2) Cam, Polistiren, Polivinil klorür, Polipropilen*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	3,158	78,439	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



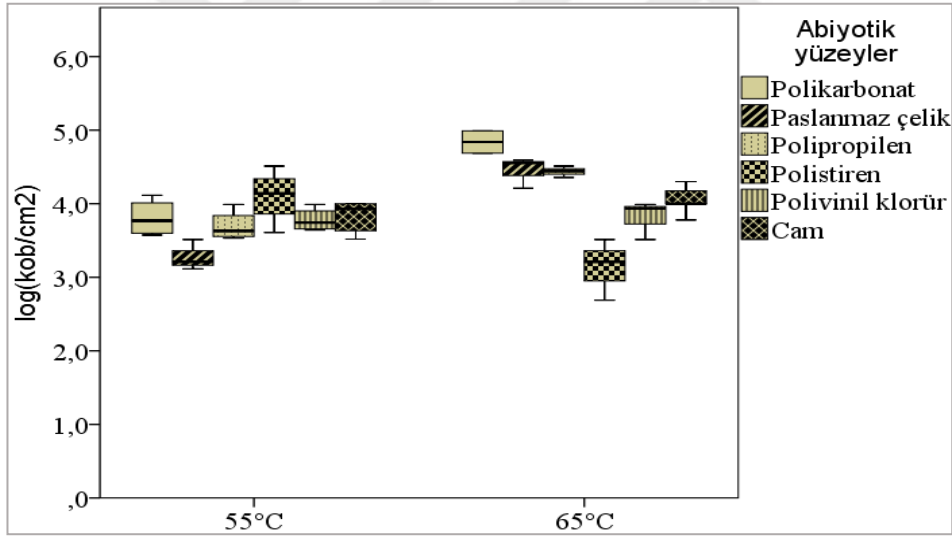
Şekil 4.47 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

G. thermodenitrificans DSM 465^T referans suşu 55 °C’de en çok hidrofilik tabiatta olan cam yüzey üzerinde, 65 °C’de ise hidrofobik tabiatta olan polikarbonat yüzey üzerinde biyofilm üretim eğilimi göstermiştir (Çizelge 4.40, Şekil 4.47).

Çizelge 4.41 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>G. thermoglucosidans</i> B84a			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) $p < 0,05$			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Cam, Polistiren, Polikarbonat* 2) Polivinil klorür, Polipropilen, Paslanmaz çelik*
Model	11,825	,000	
İntercept	11.211,244	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	25,469	,000	1) Polikarbonat, Paslanmaz çelik* 2) Polipropilen 3) Cam, Polivinil klorür, Polistiren*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	18,290	,000	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



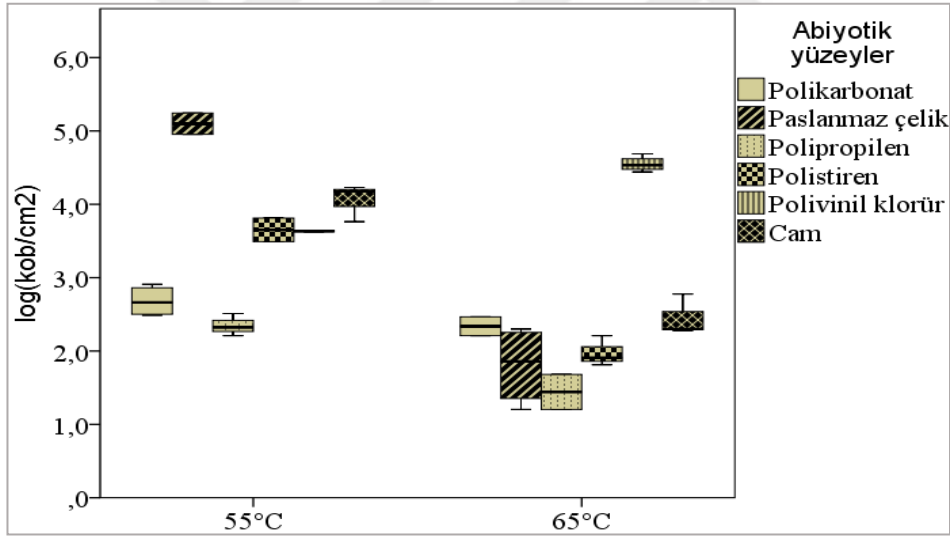
Şekil 4.48 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

G. thermoglucosidans B84a izolatının iki kritik inkübasyon sıcaklığında ve tam yağlı süt içeriğindeki biyofilm üretim davranışlarına bakıldığında hidrofilitik ve hidrofobik yüzey ayrımı görülmemektedir (Çizelge 4.41, Şekil 4.48).

Çizelge 4.42 *G. thermodenitrificans* D195 izolatının tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>G. thermodenitrificans</i> D195			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Paslanmaz çelik 2) Cam, Polivinil klorür, Polistiren* 3) Polikarbonat, Polipropilen*
Model	50,124	,000	
Intercept	3.876,696	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	144,281	,000	1) Polivinil klorür 2) Cam, Polikarbonat, Polistiren, Paslanmaz çelik, Polipropilen*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	36,324	,000	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.



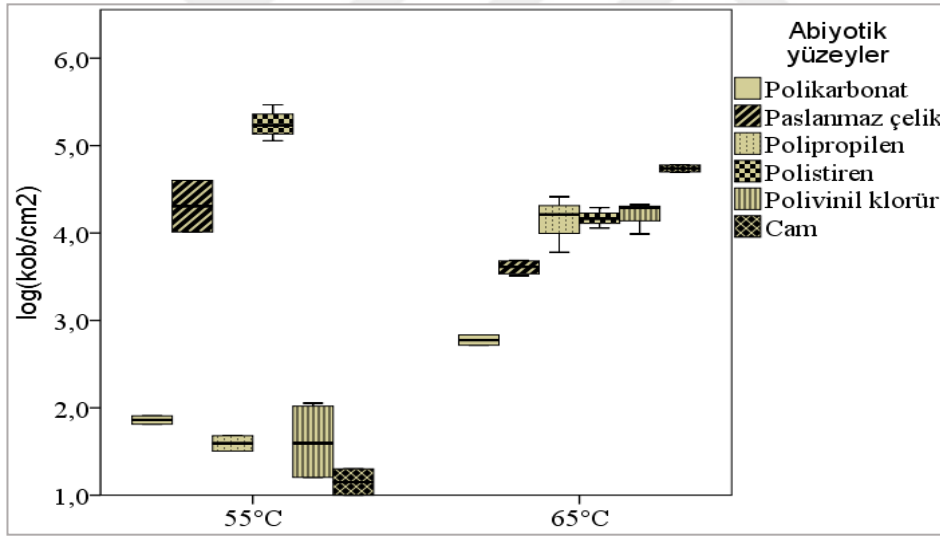
Şekil 4.49 *G. thermodenitrificans* D195 izolatının standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

G. thermodenitrificans D195 izolatı 55 °C’de ve 65 °C’de biyofilm üretimi için sırasıyla paslanmaz çelik yüzey (görece hidrofilik yüzey) ve polivinil klorür yüzey (hidrofobik yüzey) tercih etmiştir (Çizelge 4.42, Şekil 4.49).

Çizelge 4.43 *G. vulcanii* DSM 13174^T referans suşunun tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) p<0,05			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 55 °C
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Polistiren 2) Paslanmaz çelik 3) Polikarbonat, Polivinil klorür, Polipropilen, Cam*
Model	84,952	,000	
İntercept	5.146,920	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları			Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) p<0,05 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	204,767	,000	1) Cam 2) Polivinil klorür, Polistiren, Polipropilen* 3) Paslanmaz çelik 4) Polikarbonat
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	78,550	,000	

*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.

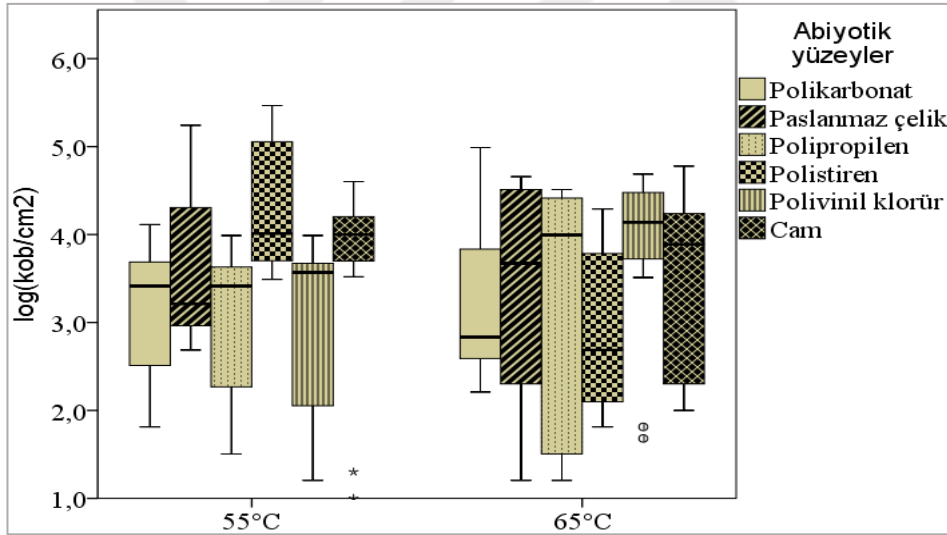


Şekil 4.50 *G. vulcanii* DSM 13174^T referans suşunun standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

G. vulcanii DSM 13174^T referans suşu 55 °C’de en çok hidrofobik bir yüzey olan polistiren yüzey üzerinde biyofilm üretirken; 65 °C’de hidrofobik bir yüzey olan cam yüzey üzerinde biyofilm üretmiştir (Çizelge 4.43, Şekil 4.50).

Çizelge 4.44 Tüm *Geobacillus* üyelerinin tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

Tüm <i>Geobacillus</i> üyeleri			
Univariate Analizi (Biyofilm Üretimi) $p < 0,05$		Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 55 °C	
Bağımlı değişkenler	F	Sig.	1) Polistiren, Cam* 2) Polivinil klorür, Polikarbonat, Polipropilen, Paslanmaz çelik*
Model	2,045	,029	
Intercept	1.553,767	,000	
İnkübasyon Sıcaklıkları	1,075	,377*	Tukey Testi (Biyofilm, İdeal Yüzey/Yüzeyler) $p < 0,05$ 65 °C
Abiyotik Yüzeyler	,514	,475*	1) Polivinil klorür, Polipropilen, Cam, Paslanmaz çelik, Polikarbonat, Polistiren*
İnkübasyon Sıcaklıkları* Abiyotik Yüzeyler	3,036	,013	
*Her bir inkübasyon sıcaklığında 6 farklı abiyotik yüzeyin biyofilm üretimi üzerine olan etkilerine göre sıralanmıştır (Yüksekten düşüğe doğru). Her bir sırada birden fazla sayıda bulunan abiyotik yüzeylerin biyofilm üretimine olan etkileri arasında istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır.			



Şekil 4.51 Tüm *Geobacillus* üyelerinin standart tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim miktarları

Tüm *Geobacillus* üyelerinin tam yağlı süt içeriğinde 6 farklı farklı abiyotik yüzey üzerindeki biyofilm üretim kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda 55 °C’de en çok polistiren ve cam yüzeyler tercih edilirken; 65 °C’de abiyotik yüzeyler arasında bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.44 ve Şekil 4.51). Çalışılan yüzeylerin hidrofobisitelerine ve hidrofilisitelerine göre mikrobiyal tutunma paternleri, inkübasyon sıcaklıklarının değişimine bağlı olarak çeşitlenebilmektedir (Çizelge 4.35-4.44). Söz konusu

çizelgelerde her iki inkübasyon sıcaklığında bakterilerin biyofilm üretim davranışlarına göre tercih ettikleri yüzeyler istatistiksel sonuçlara göre çoktan aza göre sıralanmıştır. Çalışılan *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyelerinin standart tam yağlı süt ortamında 6 farklı abiyotik yüzey üzerindeki mikrobiyal tutunma paternleri dikkate alınarak, her bir üye için daha sonraki çalışmaları yürütmek adına iki ideal yüzey seçilmiştir. Bu seçim sonucunda çalışma dahilindeki tüm termofilik basiller için biyofilm üretim davranışı açısından ele alındığında, 55 °C’de cam gibi yüksek hidrofilik özelliğe sahip bir yüzeyin, 65 °C’de ise görece hidrofilik bir karakteristiğe sahip olan 316 L tipi paslanmaz çelik yüzeyin tercih edildiği görülmektedir. 55 °C’de biyofilm üretimi açısından, camı sırasıyla polistiren ve polikarbonat takip ederken, 65 °C’de ise paslanmaz çeliği polivinil klorür ve polistiren takip etmektedir (Çizelge 4.45).

Çizelge 4.45 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyelerinin farklı abiyotik yüzeylerdeki biyofilm üretim karakteristiklerine göre iki farklı inkübasyon sıcaklığında ve standart tam yağlı süt ortamında seçilen en ideal ikişer yüzey

<i>A. caldiproteolyticus</i> A403		
55°C	Cam	Paslanmaz çelik
65°C	Polistiren	Polivinil klorür
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 [†]		
55°C	Polistiren	Polivinil klorür
65°C	Polistiren	Polivinil klorür
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81		
55°C	Polipropilen	Paslanmaz çelik
65°C	Polipropilen	Paslanmaz çelik
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 [†]		
55°C	Cam	Paslanmaz çelik
65°C	Polikarbonat	Paslanmaz çelik
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 [†]		
55°C	Cam	Polistiren
65°C	Polikarbonat	Paslanmaz çelik
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a		
55°C	Cam	Polistiren
65°C	Polikarbonat	Paslanmaz çelik
<i>G. thermodenitrificans</i> D195		
55°C	Cam	Paslanmaz çelik
65°C	Cam	Polivinil klorür
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 [†]		
55°C	Paslanmaz çelik	Polistiren
65°C	Cam	Polistiren

4.9 Farklı yağ içeriğine sahip inek sütlerindeki *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin biyofilm üretim kapasiteleri ve sporulasyon kinetikleri

Söz konusu çalışmada farklı yağ içeriğine sahip (tam yağlı (% 3,0 yağ), yarım yağlı (% 1,5 yağ) ve yağsız (% 0,1 yağ)) süt içeriklerinde, bakterilerin her biri için ideal iki yüzeydeki (Çizelge 4.45) biyofilm üretim ve spor tutunma miktarları şekil 4.52-4.61’de ve çizelge 4.46-4.47’de verilmiştir. Çalışma 48 saatlik inkübasyon süresince, iki farklı inkübasyon sıcaklığı (55 °C ve 65 °C) tercih edilerek yürütülmüştür.

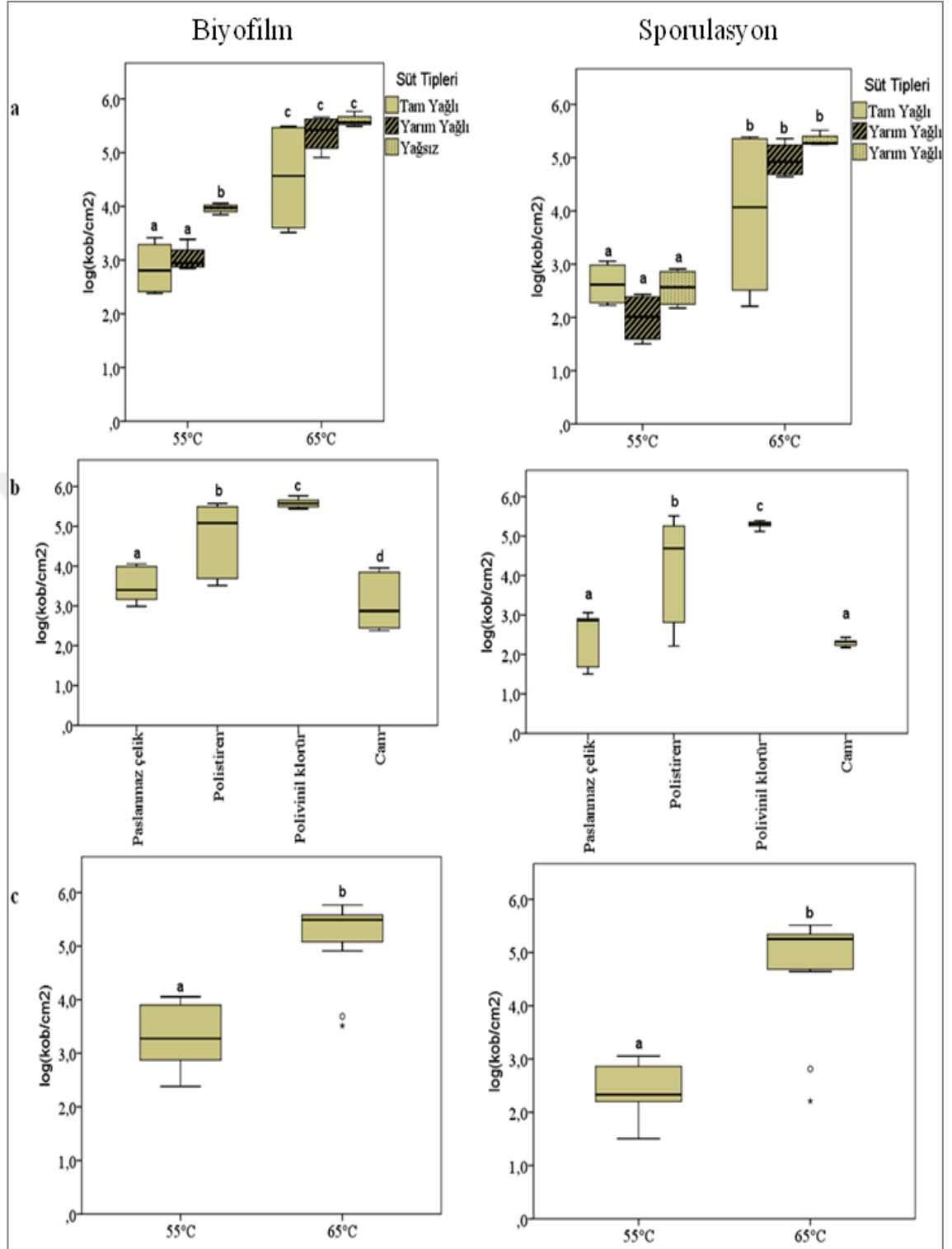
- *A. caldiprotelyticus* A403 izolatında 55 °C ve 65 °C’de biyofilm üretimi itibariyle farklı yağ içeriğine sahip sütlerin biyofilm üretimine olan katkısı eşit düzeyde saptanmıştır. Biyofilm üretimi açısından yüksek inkübasyon sıcaklığının (65 °C) biyofilm üretimine anlamlı bir katkısı olmuştur (Şekil 4.52.a). A403 izolatının en çok tercih ettiği yüzeylerde ve üç farklı yağ içeriğine sahip süt tiplerindeki biyofilm üretim-sporulasyon miktarlarına bakıldığında en çok tercih edilen abiyotik yüzeyin “polivinil klorür” olduğu görülmektedir (Şekil 4.52.b). Bu izolatın farklı sıcaklıklardaki sporulasyon miktarına bakıldığında yine 65 °C’nin daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.52.c).
- *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşu üç farklı süt tipinde biyofilm üretimi için en çok 55 °C’yi tercih ederken, sporulasyon için 65 °C’yi tercih etmektedir. Farklı süt tüpleri içerisinde hem sporulasyon hem de biyofilm üretim eğilimi açısından bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.53.a). Bu suşun en çok tercih ettiği iki yüzeyde de (polistiren ve polivinil klorür) hem sporulasyon hem de biyofilm miktarları açısından bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.53.b).
- *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında hem biyofilm üretim miktarı hem de sporulasyon miktarı en yüksek düzeyde 65 °C’de saptanmış ve her iki süreç için de farklı süt tipleri arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 4.54.a). “Palanmaz çelik” ve “polipropilen” gibi bu izolatın en çok tercih ettiği yüzeyler arasında ne sporulasyon ne de biyofilm üretimi açısından bir fark görülmüştür (Şekil 4.55.b).
- *A. tepidamans* DSM 16325^T referans suşunda biyofilm üretimi en çok “yarım yağlı süt” içeriğinde ve 65 °C’de saptanmıştır. Sporulasyon miktarı ise en çok yine 65 °C’de “yarım yağlı” ve “yağsız” süt tiplerinde saptanmıştır (Şekil 4.55.a). Bu suşun biyofilm üretimi için en çok tercih ettiği yüzey “paslanmaz çelik” olarak

belirlenirken, spor tutunması için en çok tercih ettiği yüzey “polikarbonat” olarak belirlenmiştir (Şekil 4.55.b).

- 4 *Anoxybacillus* üyesinin farklı yağ içeriğine sahip süt tiplerindeki biyofilm ve spor üretim eğilimleri genel olarak değerlendirildiğinde, biyofilm üretimi için bu cinsin, en çok tercih ettiği abiyotik yüzeyler üzerinde, inkübasyon sıcaklığının belirleyici olmadığı ancak; sporulasyon için 65 °C'nin çok daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca yine farklı süt tiplerinin sporulasyon ya da biyofilm üretim miktarı açısından belirleyici olmadığı görülmektedir (Şekil 4.56.a). Tüm 6 abiyotik yüzeylerin bu cinsin üyelerinin biyofilm üretim potansiyelleri üzerine olan etkilerine bakıldığında, yüzeyler arasında anlamlı bir fark saptanmazken, bu cinsin üyelerinin belirtilen yüzeylere sporlarının tutunma karakteristikleri değerlendirildiğinde ise “polivinil klorür” ün açık ara en ideal yüzey olduğu görülmektedir (Şekil 4.56.b).
- *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun üç farklı tipteki süt içeriklerinde hem sporulasyon hem biyofilm üretimi için en çok 65 °C'yi tercih ettiği görülmektedir. Her iki süreç için de ideal süt içeriğinin “tam yağlı süt” olduğu görülmektedir (Şekil 4.57.a). Bu suşun en çok tercih ettiği yüzeylerdeki biyofilm üretim karakteristiklerine bakıldığında cam ve polistiren yüzeylerin tercih edildiği, sporulasyon içinse paslanmaz çelik ve polikarbonat yüzeylerin tercih edildiği görülmektedir (Şekil 4.57.b).
- *G. thermoglucosidans* B84a izolatının hem biyofilm üretimi hem de sporulasyonu için en ideal süt tipinin “tam yağlı süt” olduğu görülmektedir (Şekil 4.58.a). Bu izolatın üç farklı süt tipinde en çok biyofilm ürettiği yüzeyler “paslanmaz çelik”, “cam” ve “polistiren” olarak belirlenirken, sporulasyon içinse “paslanmaz çelik” yüzey olarak belirlenmiştir (4.58.b). Söz konusu izolatın ideal yüzeylerindeki biyofilm üretim miktarları arasında inkübasyon sıcaklığının belirleyici olmadığı saptanırken, sporulasyon için 65 °C'nin daha etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 4.58.c).
- *G. thermodenitrificans* D195 izolatının biyofilm üretimi için “tam yağlı” ve “yarım yağlı” süt içerikleri ideal olarak belirlenirken, bu izolatın en çok “tam yağlı” süt içeriğinde spor üretebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.59.a). Bu izolat biyofilm üretimi için en çok “polivinil klorür” yüzeyi tercih ederken, sporulasyon için değerlendirmeye tabi tutulan yüzeyler arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 4.59.b).

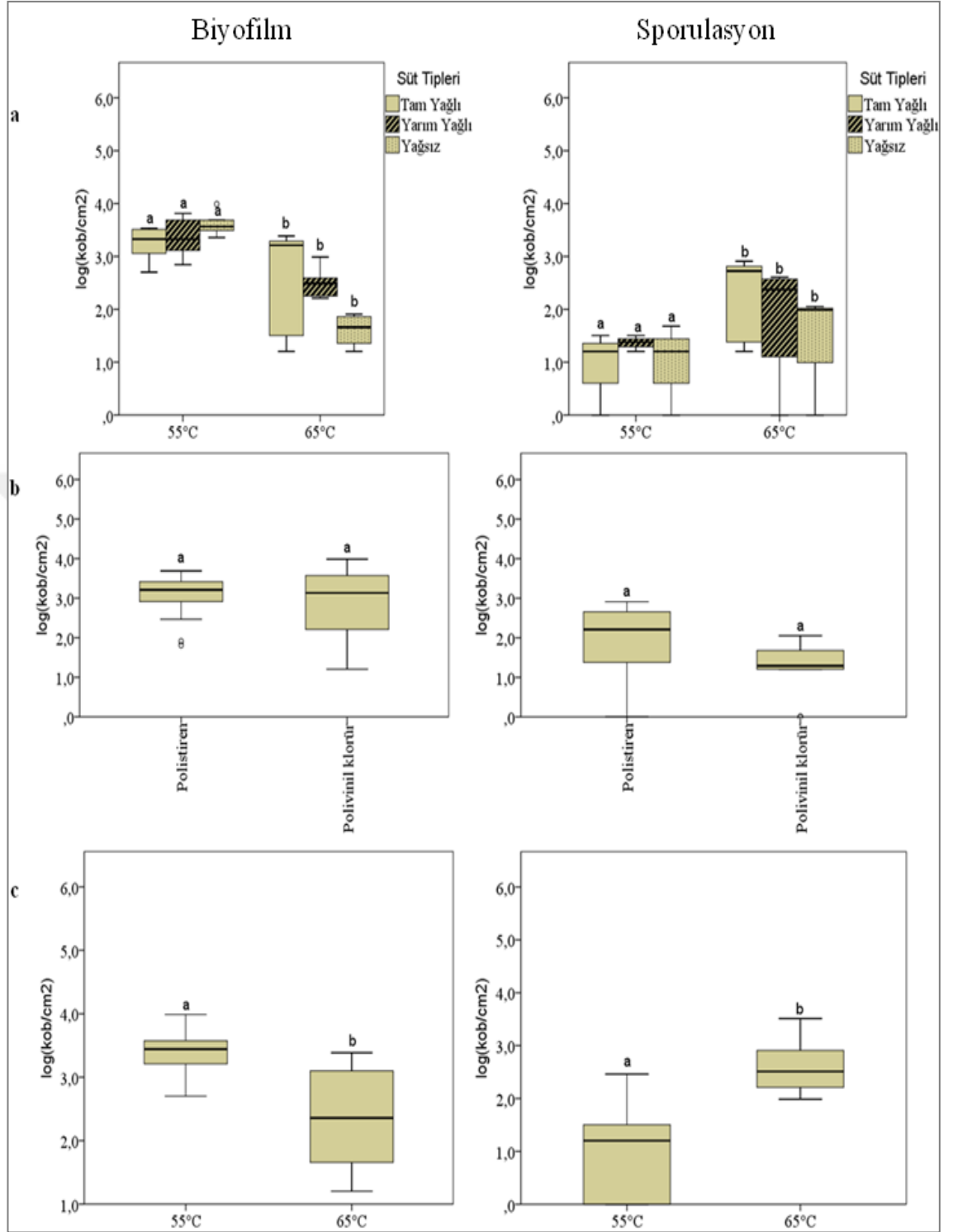
Söz konusu izolatın biyofilm üretimi için en çok tercih ettiği yüzeylerde biyofilm miktarı açısından çalışılan inkübasyon sıcaklıklarında (55 °C ve 65 °C) bir fark saptanmazken, sporulasyon miktarının 65 °C’de daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.59.c).

- *G. vulcanii* DSM 13174^T suşunda biyofilm üretimi için en ideal süt içeriği olarak “yağsız süt”, sporulasyon içinse hem “yarım yağlı” hem de “yağsız” süt içeriklerinin ideal olduğu görülmektedir (Şekil 4.60.a). Bu suşun biyofilm üretimi için en ideal yüzey “paslanmaz çelik” olarak belirlenirken, sporulasyon miktarı için “polikarbonat” yüzey belirlenmiştir (Şekil 4.60.b). Söz konusu suşun en çok tercih ettiği yüzeylerdeki biyofilm üretim miktarlarına bakıldığında inkübasyon sıcaklıklarının belirleyici olmadığı görülmektedir. Sporulasyon miktarının ise 65 °C’de daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.60.c).
- *Geobacillus* cinsinin tüm üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip süt örneklerindeki biyofilm üretim miktarları arasında bir fark saptanmamıştır. Cinsin üyelerinin genel olarak sporulasyon eğilimleri değerlendirildiğinde ise “tam yağlı” ve “yarım yağlı” süt içeriklerinin ideal içerikler olduğu görülmektedir (Şekil 4.61.a). Bu cinsin üyelerinin biyofilm üretimi için en çok tercih ettiği yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim miktarlarının üç farklı tipinde de farklı olmadığı belirlenmiştir ancak; sporulasyon için “polikarbonat”, “paslanmaz çelik” ve “polivinil klorür” yüzeylerin daha çok tercih edildiği görülmektedir (Şekil 4.61.b). Cinsin genel olarak biyofilm üretiminin ve sporulasyon miktarının 65 °C’de daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.61.c).



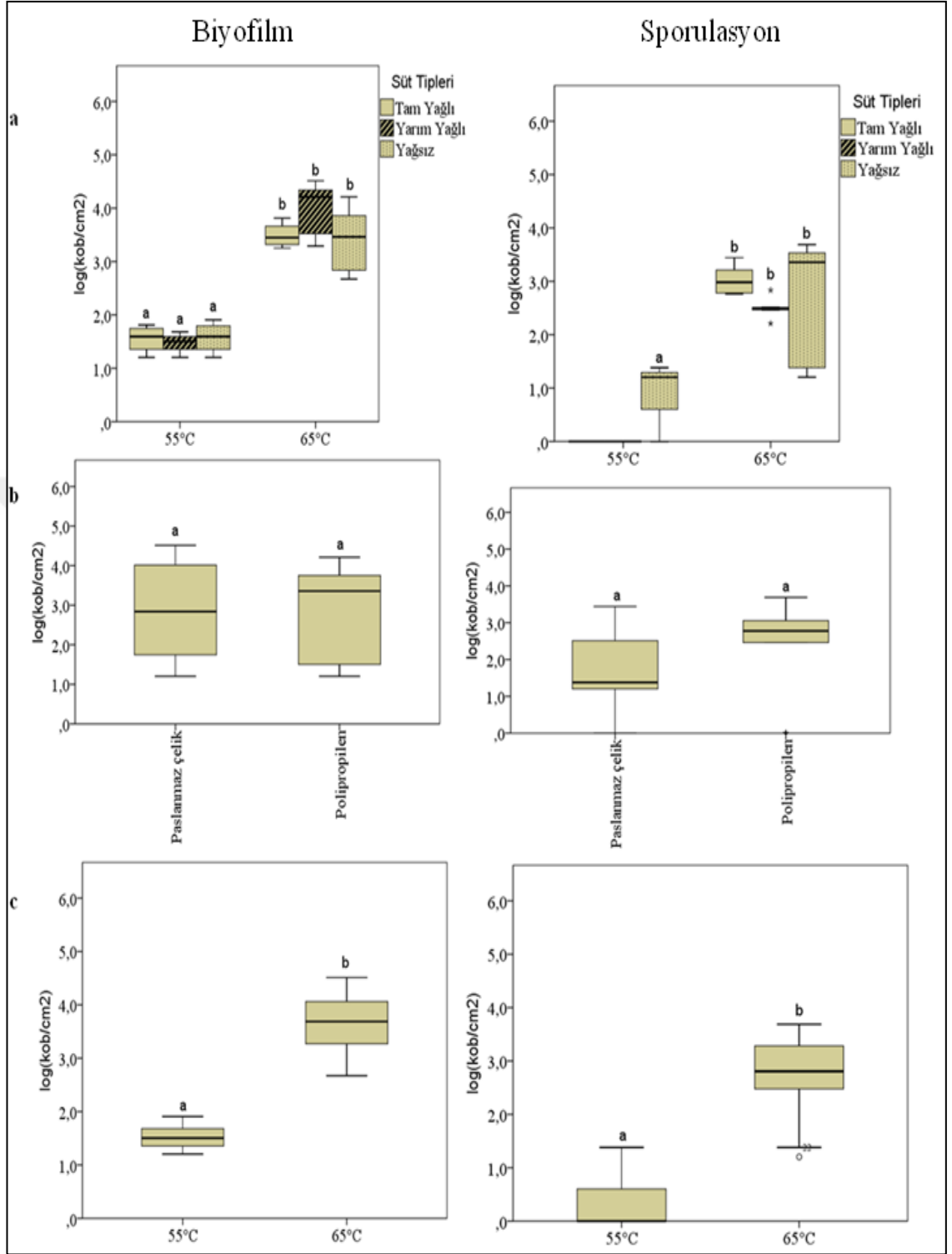
Şekil 4.52 *A. caldiproteolyticus* A403 izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatiki açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğunu işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



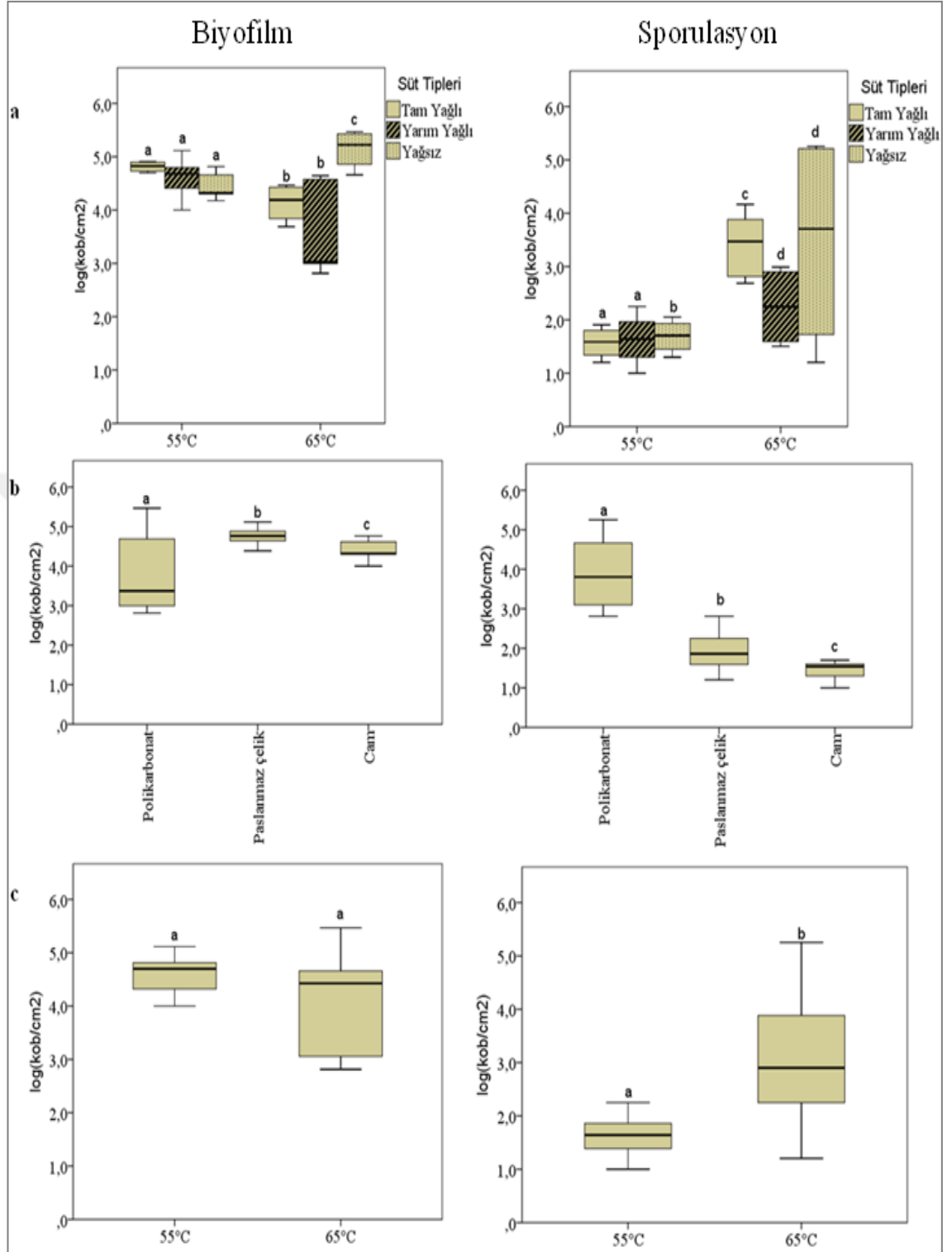
Şekil 4.53 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatiki açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



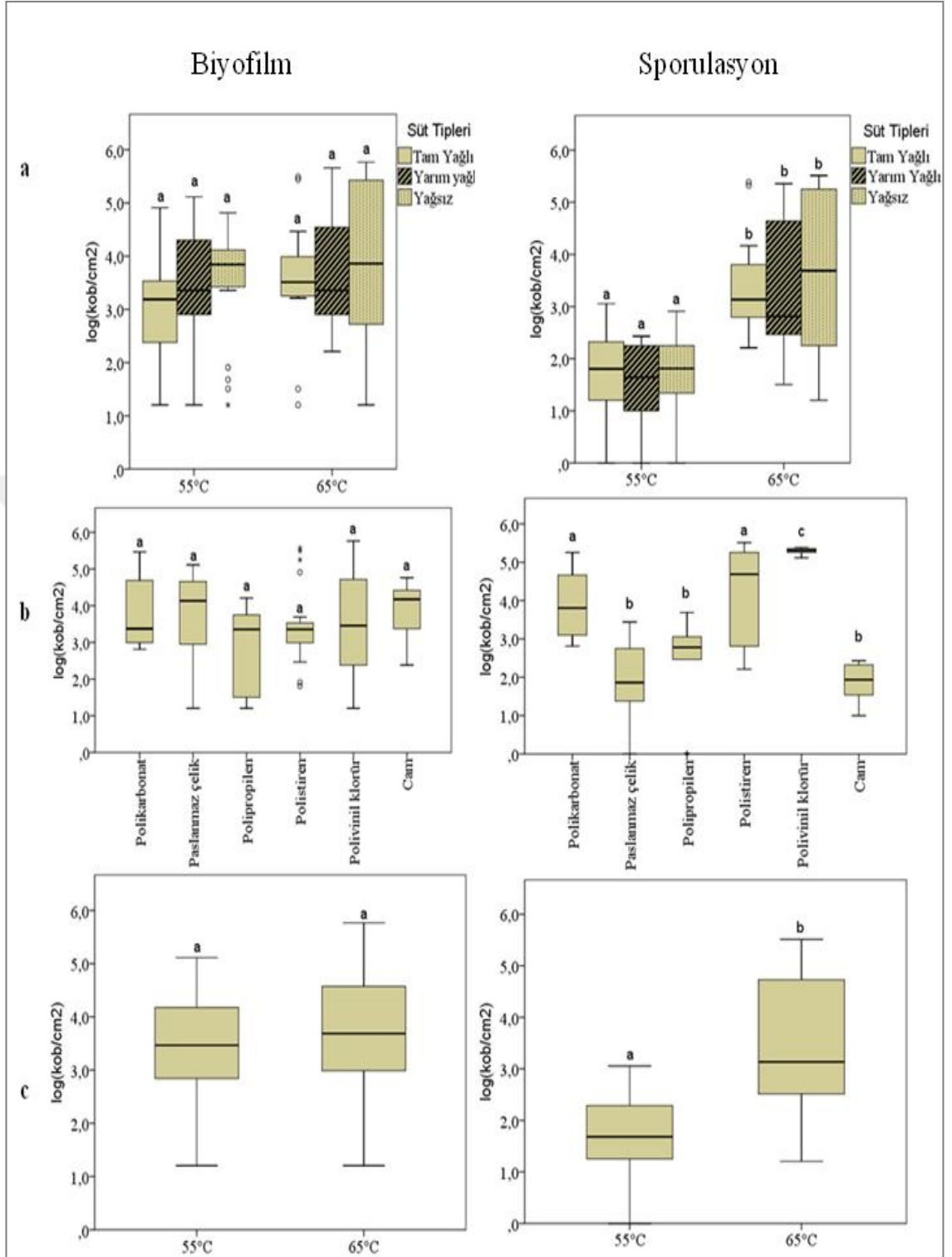
Şekil 4.54 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatiki açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



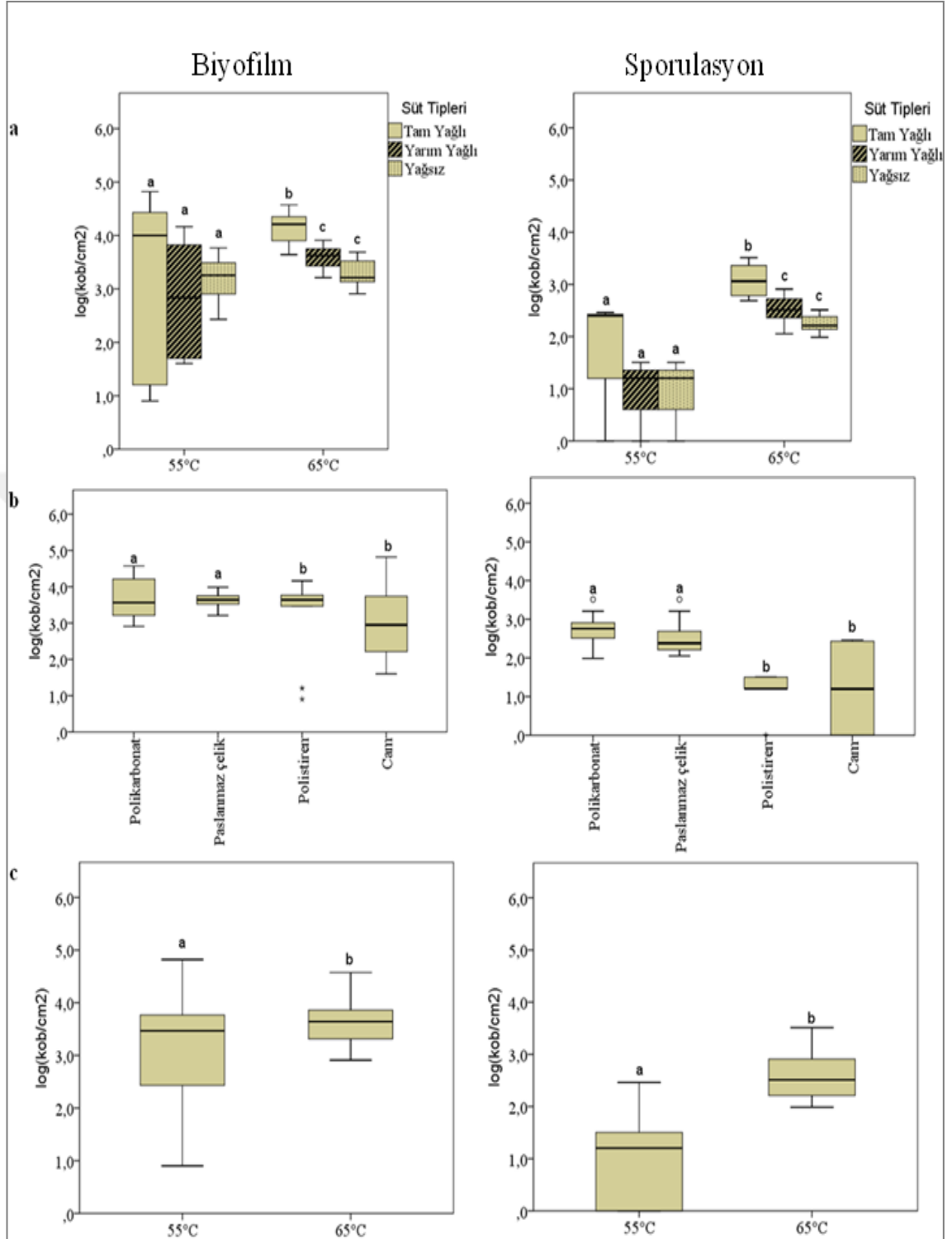
Şekil 4.55 A. *tepidamans* DSM 16325^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistik açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



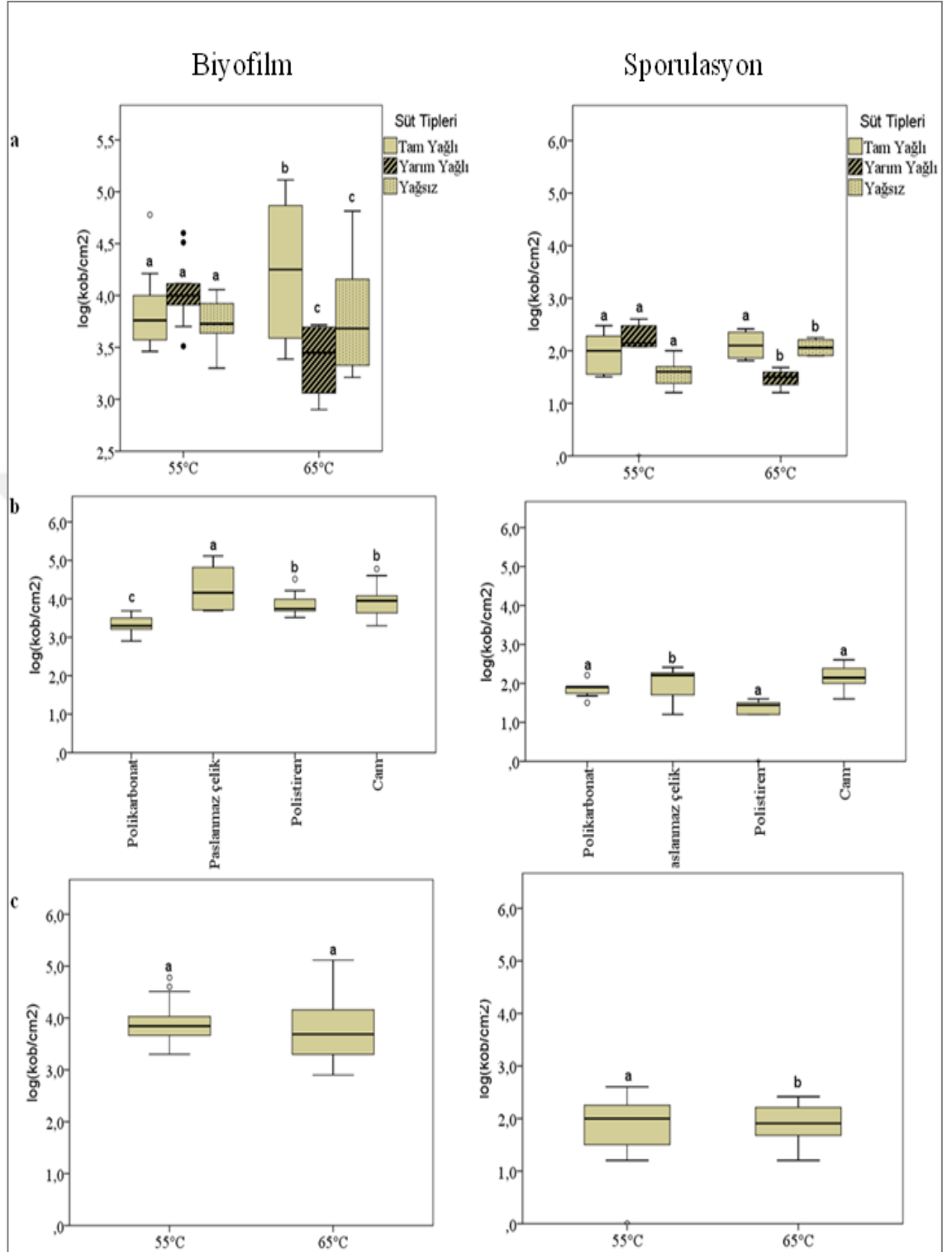
Şekil 4.56 Tüm *Anoxybacillus* üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistik açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



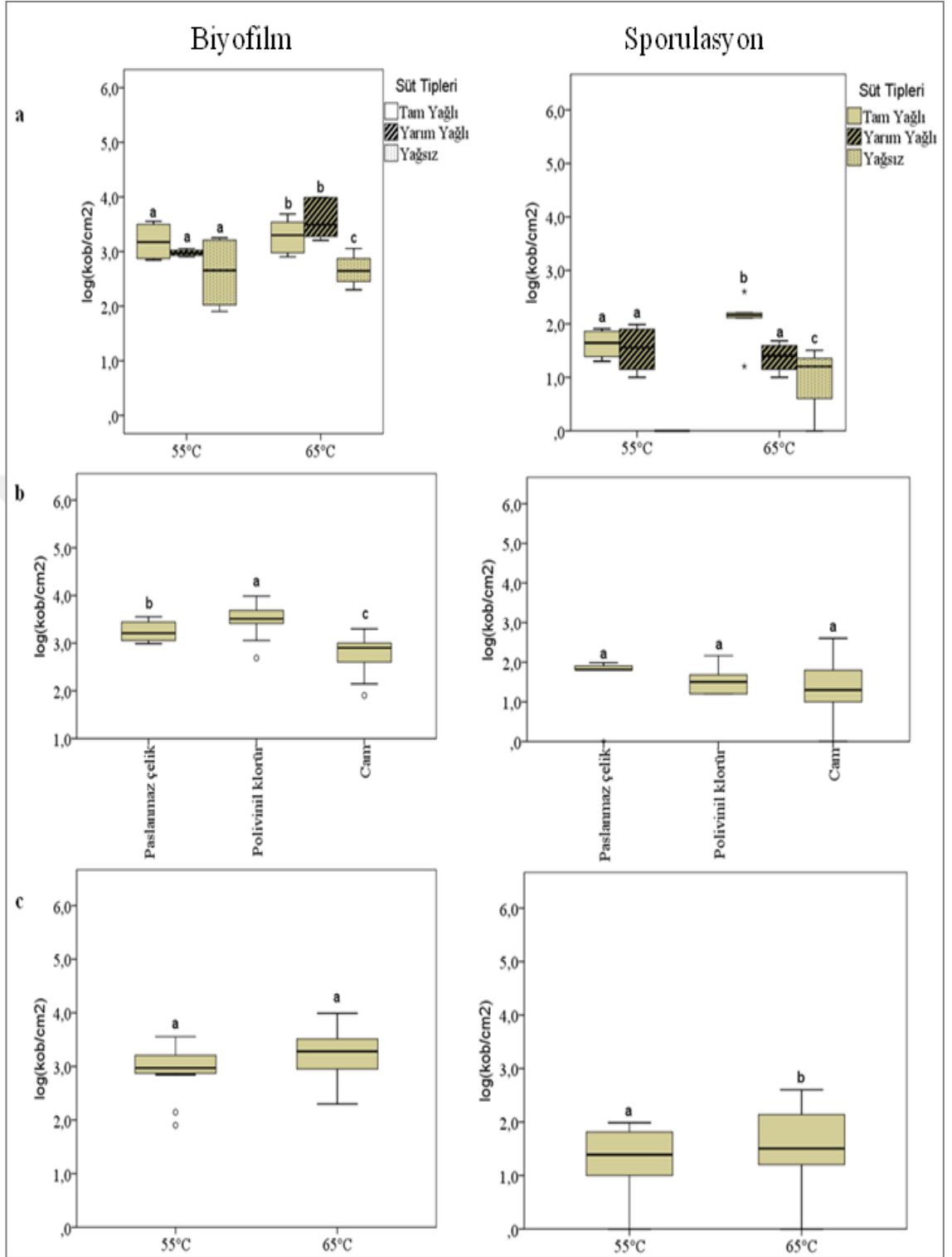
Şekil 4.57 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatiki açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



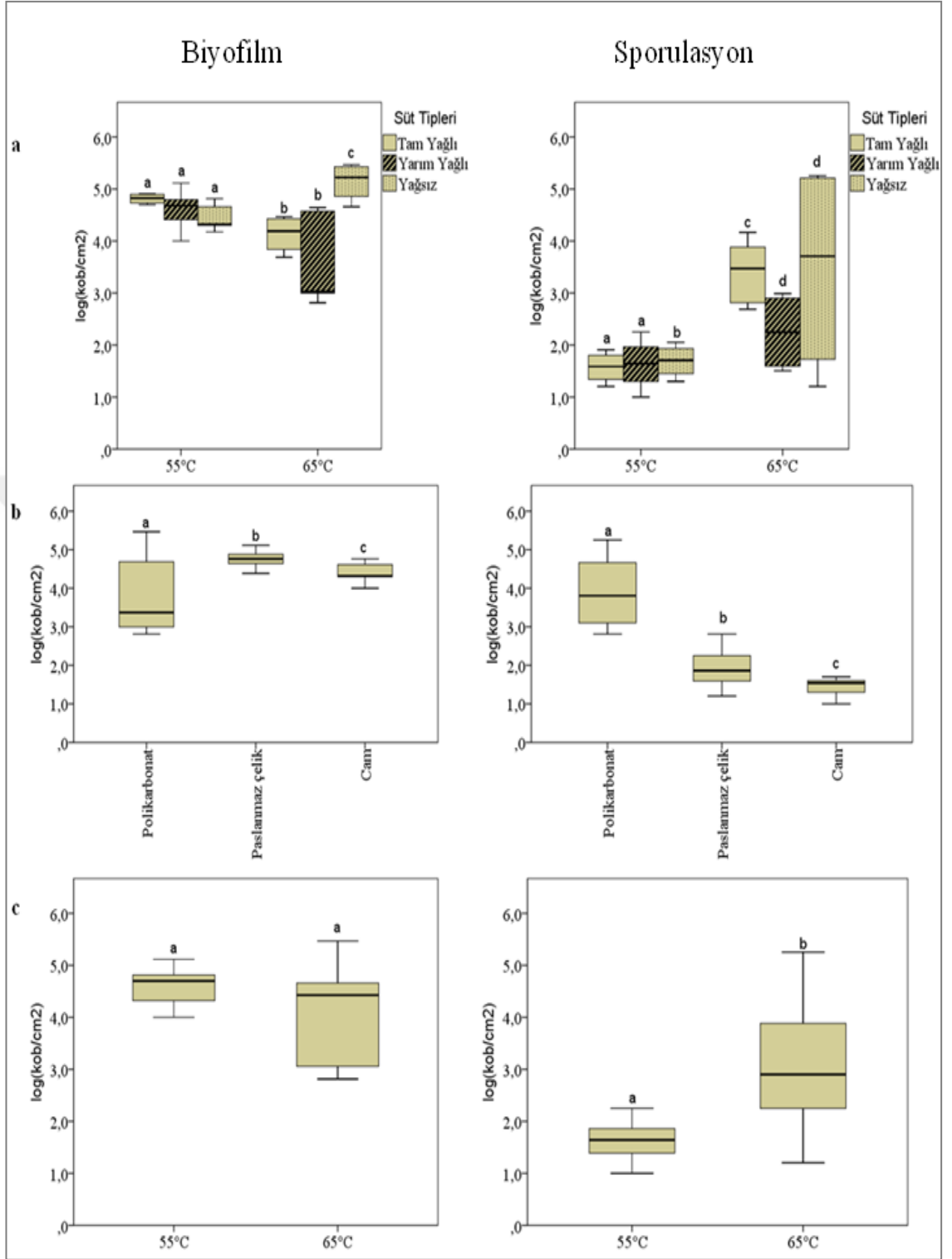
Şekil 4.58 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistik açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



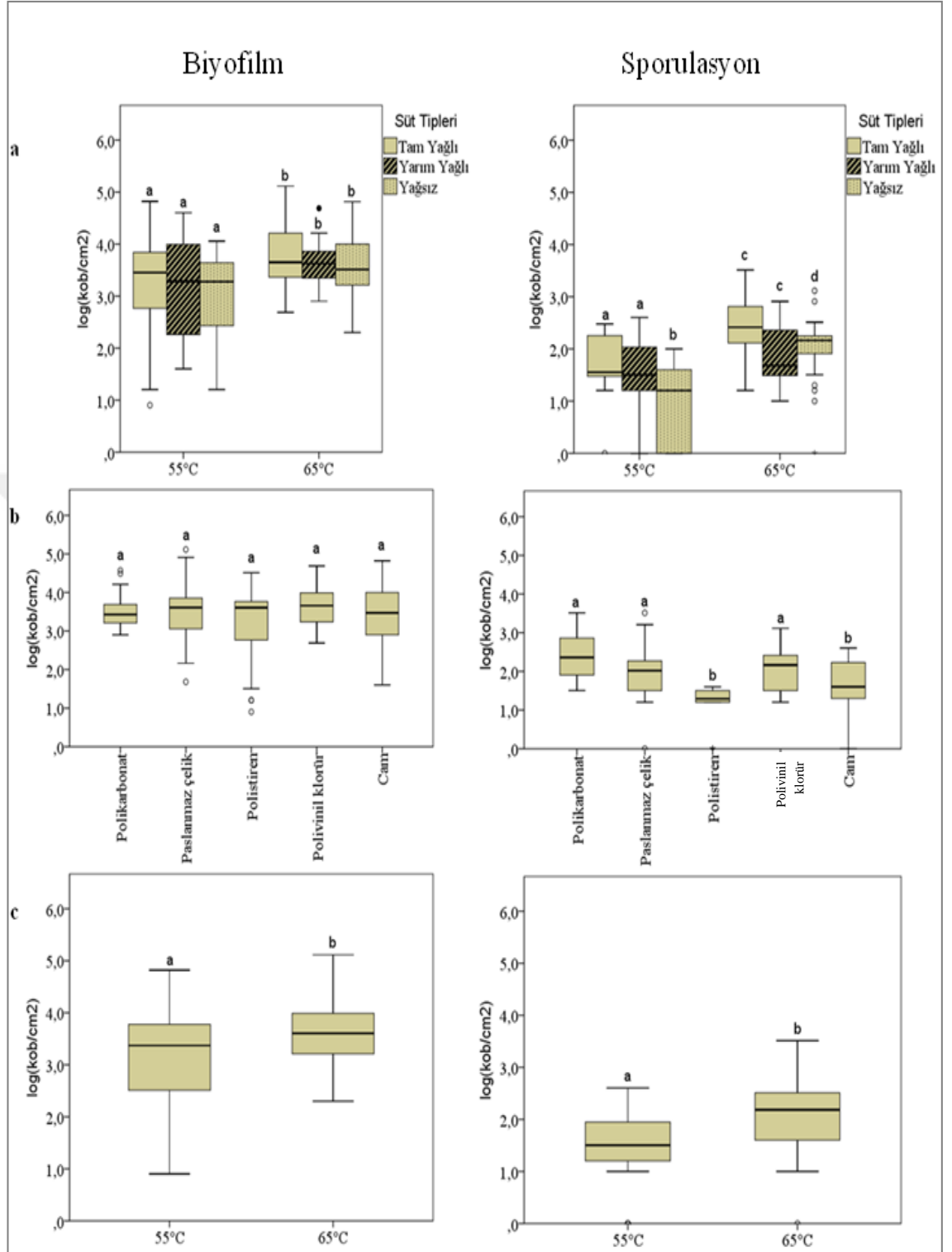
Şekil 4.59 *G. thermodenitrificans* D195 izolatının üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistikî açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.60 *G. vulcanii* DSM 13174^T referans suşunun üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistik açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).



Şekil 4.61 Tüm *Geobacillus* üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip süt ortamındaki biyofilm üretim karakteristikleri ve sporulasyonu

a. Üç farklı yağ içeriğine sahip süt, b. İzolatın ideal yüzeyleri, c. İnkübasyon sıcaklıkları (Aynı harfler istatistikî açıdan ortalamalar arasında fark olmadığını, farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir (Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi, $p < 0,05$).

Çizelge 4.46 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip sütteki biyofilm üretim ve sporulasyon eğilimleri

İnkübasyon Sıcaklığı	Biyofilm						Sporulasyon					
	55°C			65°C			55° C			65°C		
	TYS	YYS	Y.sız	TYS	YYS	Y.sız	TYS	YYS	Y.sız	TYS	YYS	Y.sız
Süt Tipleri												
<i>A. caldiproteolyticus</i> A403												
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T												
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81												
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T												
<i>Anoxybacillus</i> Toplam	4	3	4	4	3	3	2	2	4	3	4	4
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T												
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a												
<i>G. thermodenitrificans</i> D195												
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T												
<i>Geobacillus</i> Toplam	4	3	3	3	2	1	4	4	3	4	1	1
Genel Toplam	8	6	7	7	5	4	6	6	7	7	5	5

*(Kırmızı ile işaretli kutular istatistiksel anlamda en ideal sonuç/sonuçları yansıtmaktadır, Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi), (TYS; tam yağlı süt, YYS; yarım yağlı süt, Y.sız; yağsız süt).

Çizelge 4.47 *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi üyelerinin üç farklı yağ içeriğine sahip sütte ve en ideal yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim ve sporulasyon eğilimleri

İnkübasyon Sıcaklığı	Biyofilm												Sporulasyon											
	55°C						65°C						55°C					65°C						
	PÇ	PC	PS	PP	PVC	Cam	PÇ	PC	PS	PP	PVC	Cam	PÇ	PC	PS	PP	PVC	Cam	PÇ	PC	PS	PP	PVC	Cam
<i>A. caldiproteolyticus</i> A403																								
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T																								
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81																								
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T																								
Anoxybacillus Toplam	2	-	2	1	1	-	2	-	1	1	-	1	3	-	1	-	1	2	1	1	1	1	1	-
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T																								
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a																								
<i>G. thermodenitrificans</i> D195																								
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T																								
Geobacillus Toplam	3		3	-	-	2	2	-	-	-	2	1	1	-	3	-	-	2	1	1	-	-	1	1
Genel Toplam	5		5	1	1	2	4	-	1	1	2	2	4		4	-	1	4	2	2	1	1	2	1

*(Kırmızı ile işaretli kutular istatistiksel anlamda en ideal sonucu yansıtmaktadır, Tukey Testi, Karşılaştırmalı T Testi), (PÇ; paslanmaz çelik, PC; polikarbonat, PS; polistiren, PP; polipropilen, PVC; polivinil klorür).

Anoxybacillus üyeleri biyofilm üretimi için 55 °C’de en çok “tam yağlı” ve “yağsız” süt içeriklerini tercih ederken, 65 °C’de “tam yağlı süt” içeriğini tercih etmiştir. *Geobacillus* üyeleri her iki inkübasyon sıcaklığında da biyofilm üretimi için “tam yağlı süt” içeriğini tercih etmiştir. Her iki cinsin farklı yağ içeriğine sahip süt içeriklerindeki sporulasyon miktarlarına bakıldığında, *Anoxybacillus* cinsi üyeleri 55 °C’de en çok “yağsız süt” içeriğinde spor üretirken, 65 °C’de en çok “yarım yağlı” ve “yağsız süt” içeriklerinde spor üretmiştir. *Geobacillus* üyeleri 55 °C’de en çok “tam yağlı” ve “yarım yağlı” süt içeriklerinde spor üretirken, 65 °C’de en çok “tam yağlı” süt içeriğinde spor üretmiştir (Çizelge 4.46).

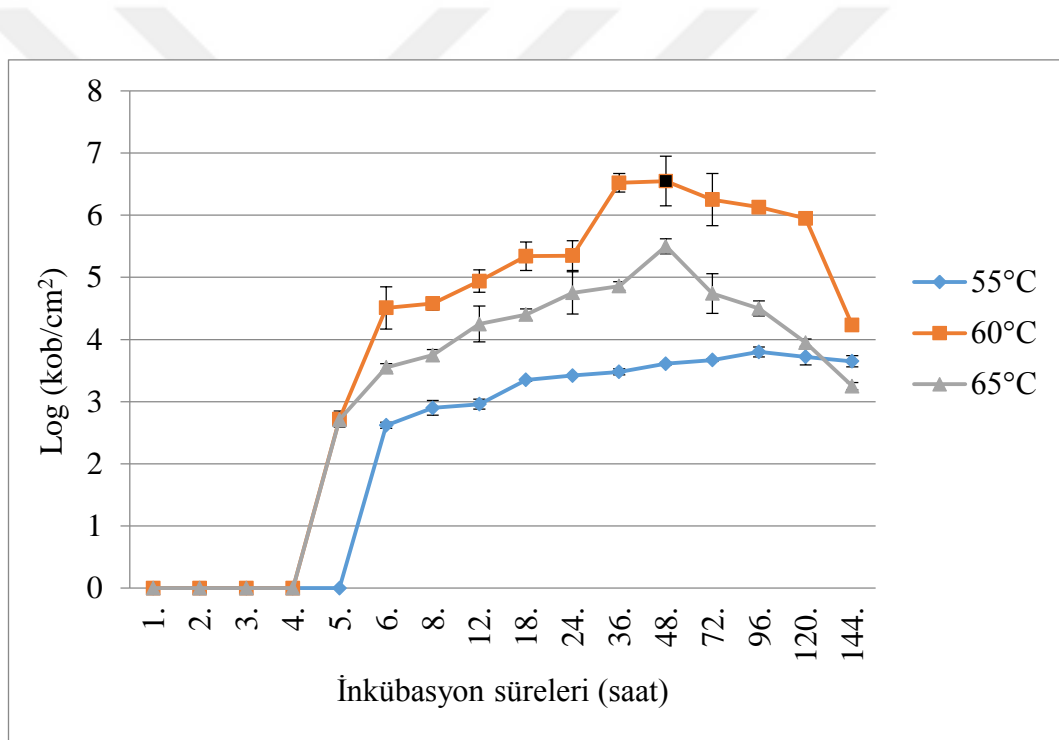
İki cinsin en çok tercih ettikleri abiyotik yüzeylerde ve farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki biyofilm üretim ve sporulasyon miktarları değerlendirildiğinde; *Anoxybacillus* üyelerinin 55 °C’de en çok “paslanmaz çelik” ve “polistiren” yüzeylerde biyofilm üretebildiği, 65 °C’de ise en çok “paslanmaz çelik” yüzeylerde biyofilm üretebildiği görülürken, *Geobacillus* üyeleri 55 °C’de en çok “paslanmaz çelik” ve “polistiren” yüzeylerde, 65 °C’de ise “paslanmaz çelik ve “polivinil klorür” yüzeylerde biyofilm üretmiştir. İki cinsin de en çok tercih ettiği abiyotik yüzeyler üzerindeki spor tutunma miktarlarına bakıldığında; *Anoxybacillus* üyelerinin 55 °C’de en çok “paslanmaz çelik” yüzeyi tercih ettiği, 65 °C’de “cam” yüzey haricinde (spor saptanmadı) yüzeyler arasında spor tutunması açısından bir fark olmadığı görülmektedir. *Geobacillus* üyelerinde 55 °C’de en çok “polistiren” yüzeyde spor tutunması görülürken, 65°C’de ise “paslanmaz çelik”, “polikarbonat”, “polivinil klorür” ve “cam” yüzeyler arasında spor tutunması itibariyle bir fark görülmemektedir (Çizelge 4.47).

4.10 *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşlarının standart tam yağlı süt içeriğinde ve statik koşullarda zamana bağlı biyofilm üretim yanıtlarının belirlenmesi

Bu çalışma, ilgili iki referans suşun 316 L tipi paslanmaz çelik yüzeylerde iyi düzeyde biyofilm üretebildiği verilerinden ve bu tip paslanmaz çeliğin gıda endüstrisinde çok yaygın kullanılıyor olmasından hareketle, ileri aşamadaki “biyofilm giderim” stratejilerinin değerlendirileceği çalışmalarda zamana bağlı olarak hangi noktada

giderim için müdahale edilmesi gerektiği hususunda fikir vermiştir. Ayrıca, uzun süreli bir inkübasyon sürecindeki biyofilm oluşum kinetiklerinin açıklığa kavuşturulması açısından da kritik verilerin elde edilmesi adına önem arz etmektedir. Bu bağlamda çalışılan iki referans suşun üç kritik sıcaklıkta (55-60-65 °C) ve farklı inkübasyon sürelerinde (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 saat) standart tam yağlı süt içerisindeki paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm örneklemeleri yapılmıştır.

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında ve farklı inkübasyon sürelerinin sonunda, her iki referans suş içinde elde edilen biyofilm sayım sonuçları Şekil 4.62 ve 4.63'te verilmiştir.

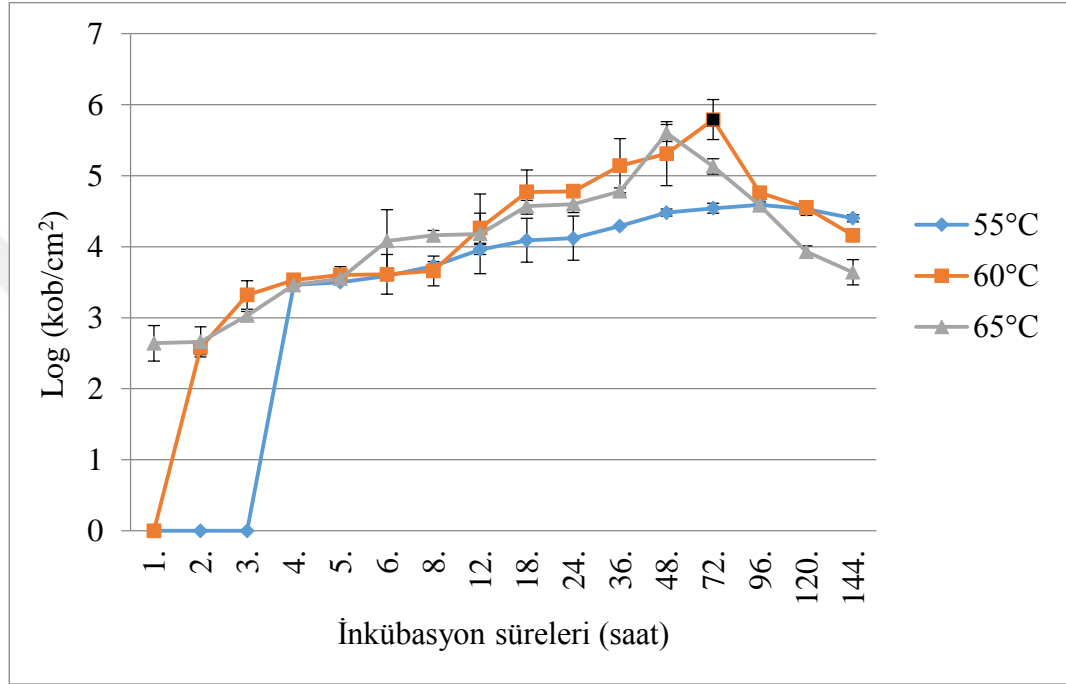


Şekil 4.62 A. flavithermus DSM 2641T suşunun standart tam yağlı süt içeriğindeki ve farklı inkübasyon sıcaklık-sürelerdeki sayım sonuçları

(Siyah işaretli nokta en yüksek biyofilm üretim koşulunu göstermektedir, One-Way ANOVA, Tukey Testi, $p < 0,05$)

A. flavithermus DSM 2641^T suşunun biyofilm gelişim kinetiğine bakıldığında, biyofilm üretimine geçişin yüksek inkübasyon sıcaklıklarında (60 °C ve 65 °C) daha erken safhada (5. saat) başladığı görülmektedir. Yine biyofilm yapısını oluşturan hücre sayısındaki artışın belirtilen yüksek inkübasyon sıcaklıklarında daha fazla olduğu

görülmektedir. Uzun süreli inkübasyonda her üç inkübasyon sıcaklığında da biyofilm üretimi 48. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. Yüksek sıcaklıklarda, uzun inkübasyon sürelerinde (>72 saat) biyofilm hücre sayısında azalma saptanmıştır (Şekil 4.62). En yüksek biyofilm üretim miktarı bu suş için, 60 °C’de ve 48. saatte saptanmıştır (One-Way ANOVA, Tukey Testi, $p<0,05$).



Şekil 4.63 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun standart tam yağlı süt içeriğindeki ve farklı inkübasyon sıcaklık-sürelerdeki sayım sonuçları

Siyah işaretli nokta en yüksek biyofilm üretim koşulunu göstermektedir, One-Way ANOVA, Tukey Testi, $p<0,05$.

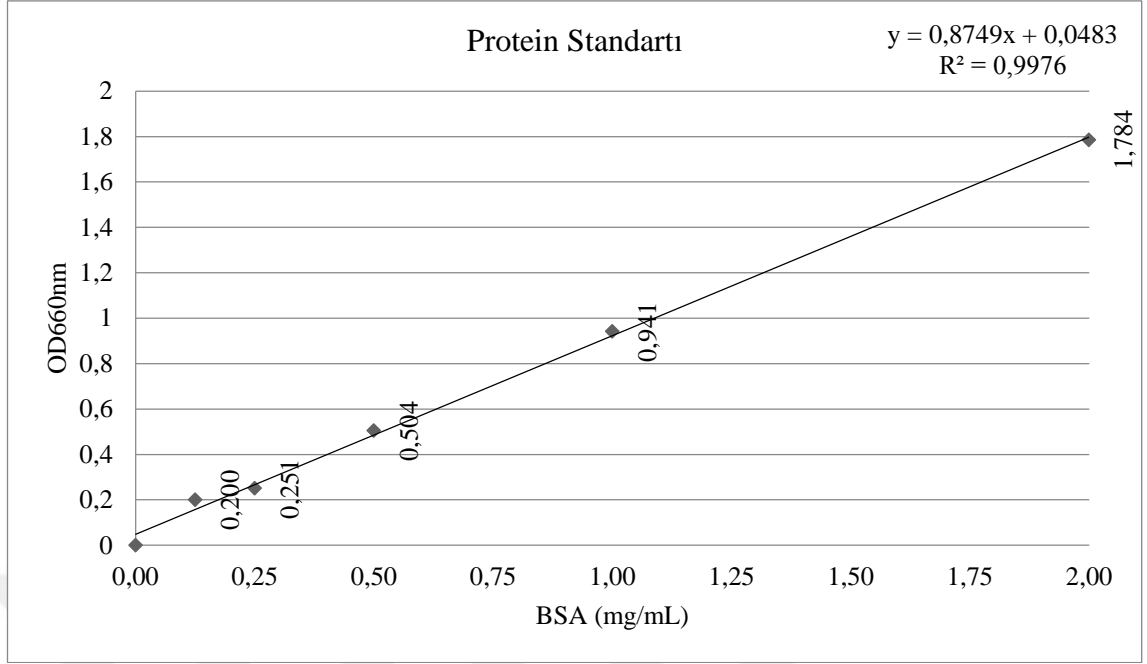
G. thermodenitrificans DSM 465^T suşunun biyofilm gelişim kinetiğine bakıldığında, biyofilm üretimine geçişin yine yüksek inkübasyon sıcaklıklarında (60 °C ve 65 °C) daha erken safhada (1. saat, 65 °C; 2. saat, 60 °C) başladığı görülmektedir. Yine biyofilm yapısını oluşturan hücre sayısındaki artışın belirtilen yüksek inkübasyon sıcaklıklarında daha fazla olduğu görülmektedir. Uzun süreli inkübasyonda 60 °C inkübasyon sıcaklığında biyofilm üretimi 72. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu suşta *A. flavithermus* DSM 2641^T suşuna benzer şekilde yüksek sıcaklıklarda, uzun inkübasyon sürelerinde (>72 saat) biyofilm hücre sayısında azalma saptanmıştır (Şekil 4.63). En yüksek biyofilm üretim miktarı bu suş için, 60 °C’de 48. ve 72. saatte

saptanmıştır (One-Way ANOVA, Tukey Testi, $p<0.05$). Belirtilen sıcaklıktaki inkübasyon sürelerinde biyofilm üretimi yönünden istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır.

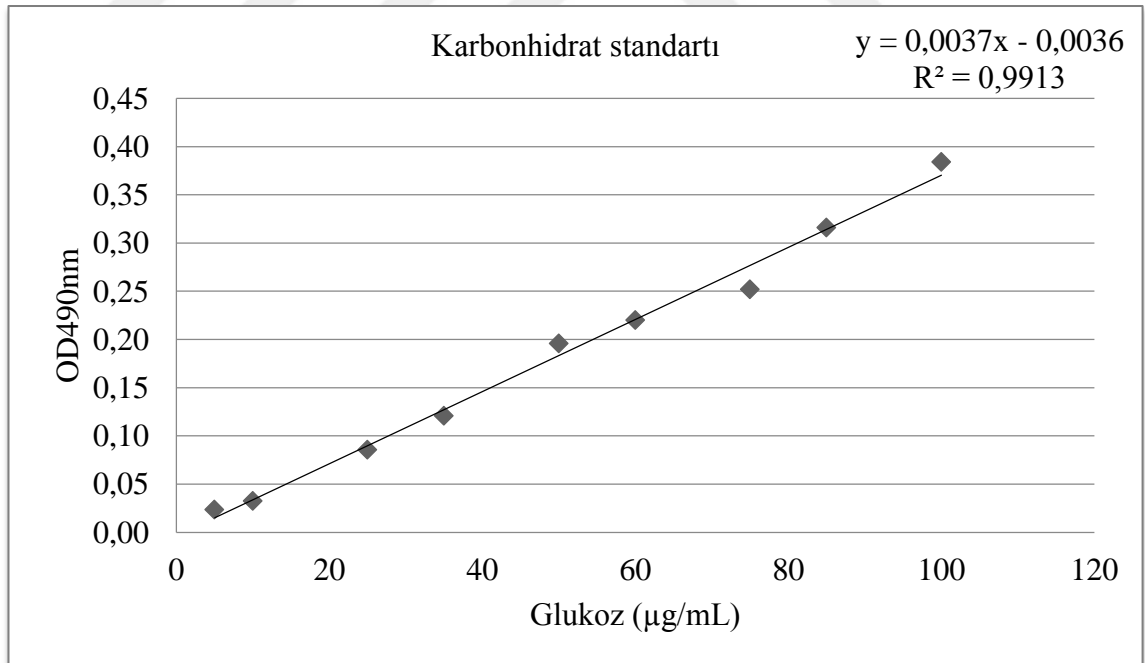
Bu çalışma ileriki aşamalarda gerçekleştirilecek olan biyofilm giderim çalışmalarına temel teşkil etmesi adına gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışma dahilinde belirlenen inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları (*Anoxybacillus* için 60 °C, 48 saat; *Geobacillus* için 60°C, 72 saat) giderim çalışmalarında esas alınmıştır.

4.11 Termofilik biyofilmlerin protein, karbohidrat ve eDNA içeriklerinin belirlenmesi

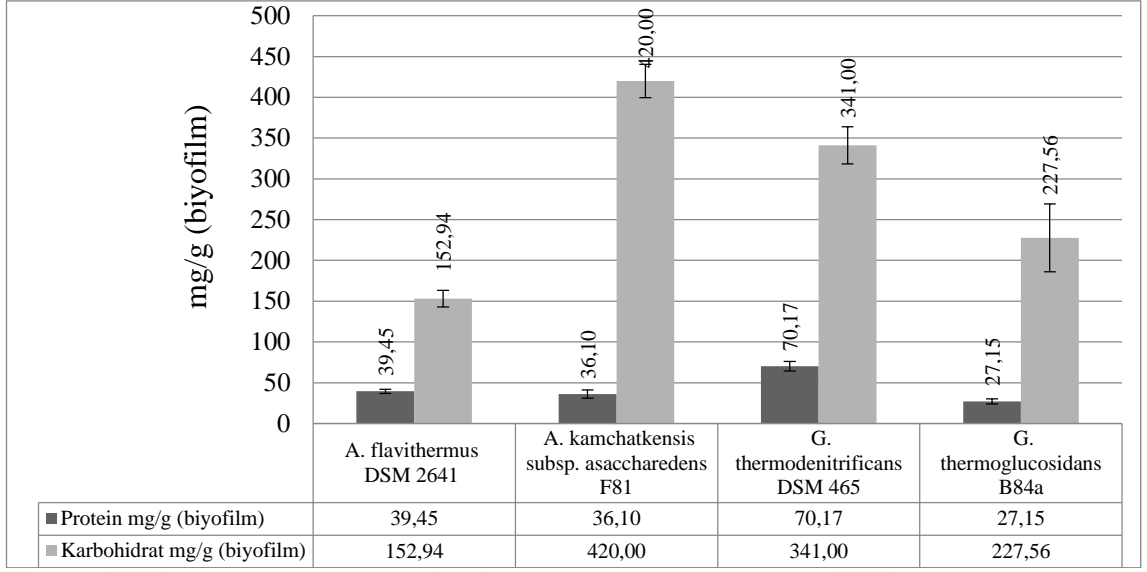
Bakterilerin biyofilm matrikslerindeki total karbonhidrat ve protein miktarları, kalibrasyon grafiği verilerinden elde edilen standart eğri formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.64.a - 4.64.b). Total protein ve karbohidrat içeriklerine yönelik sonuçlar şekil 4.65'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının biyofilminde en yüksek karbohidrat içeriğine rastlanmıştır. Biyofilm matriksindeki en yüksek protein içeriğine ise *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referansında rastlanmıştır (Tukey Testi, $p<0,05$).



Şekil 4.64.a Termofilik basillerin biyofilm matrikslerindeki total protein içeriği belirlenirken referans alınan protein standardı



Şekil 4.64.b Termofilik basillerin biyofilm matrikslerindeki total karbonhidrat içeriği belirlenirken referans alınan protein standardı



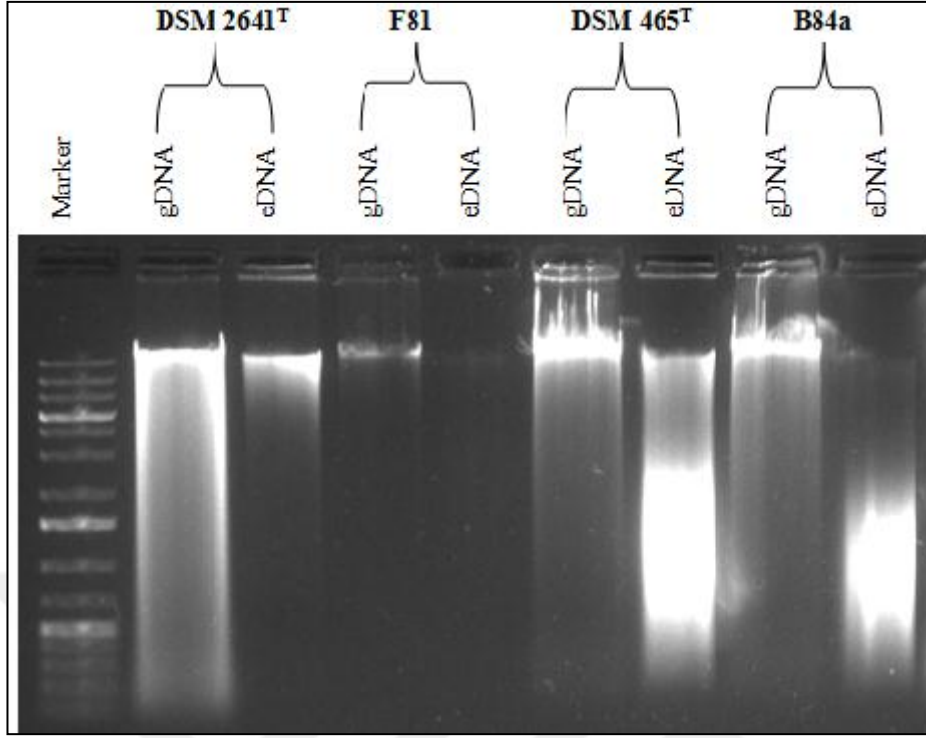
Şekil 4.65 Termofilik basil biyofilm matrikslerindeki toplam karbohidrat ve protein miktarları

Çalışma kapsamındaki termofilik basillerin biyofilm matrikslerindeki yaş biyomas kütlelerinin gramının başına düşen eDNA içerikleri ve genomik DNA-eDNA moleküler büyüklükleri çizelge 4.48’de verilmiştir.

Çizelge 4.48 Termofilik biyofilm matrikslerinden elde edilen eDNA içeriklerinin konsantrasyonları ve genomic DNA-eDNA moleküler büyüklükleri

Bakteri adı ve kodu	eDNA Konsantrasyonu (ng/g)	gDNA Büyüklüğü (kb)	eDNA Büyüklüğü (kb)
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	389	24,3	21,7
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81	821	25,1	23,8
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	554	26,2	20,6
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a	187	25,5	22,3

Elde edilen bulgulardan hareketle biyofilm matriksinde en yüksek eDNA içeriğine *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının sahip olduğu görülmektedir. Genomik DNA (gDNA) ve eDNA moleküllerinin agaroz jelde moleküler büyüklüklerinin hesaplanmasına yönelik sonuçlar da şekil 4.66’da verilmiştir.

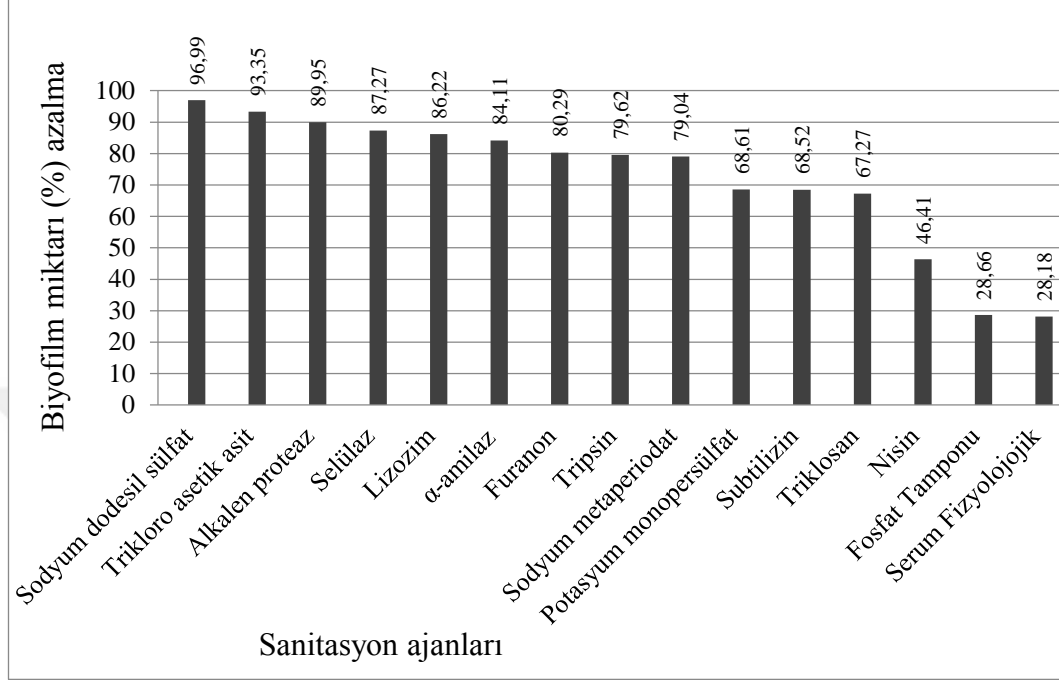


Şekil 4.66 Termofilik basillerin Genomik DNA ve eDNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre molekül ağırlıklarının hesaplanması

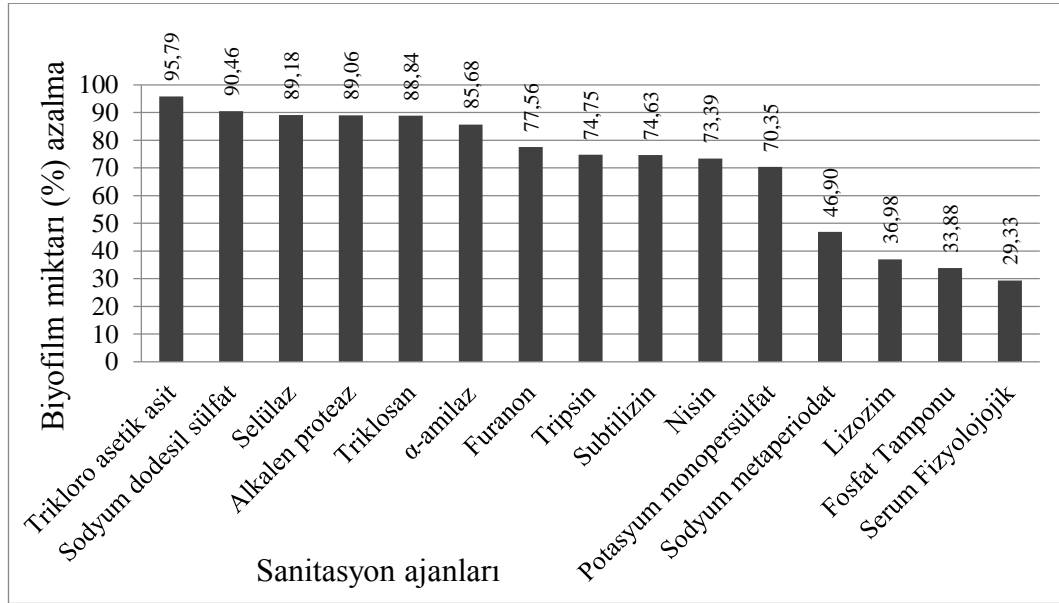
4.12 Tam yağlı süt içeren polistiren mikrotitrasyon plakalarında geliştirilen termofilik biyofilmlerin çeşitli sanitasyon ajanlarıyla giderimi

Sanitasyon stratejilerinin mikrotitre plaka kuyularındaki tam yağlı süt içeriğinde geliştirilen termofilik biyofilmlerin giderimine yönelik elde edilen bulgular Şekil 4.67-4.70'te sırasıyla verilmiştir. Her bir izolat ve referans suş için mikrotitre plaka kuyularındaki biyofilm giderim miktarı (%) yüksek etkinlik gösteren sanitasyon ajanından düşük etkinlik gösteren sanitasyon ajanına doğru büyükten küçüğe sıralanmıştır. En yüksek biyofilm sanitasyon etkinliği protein parçalayan bir kimyasal olan **sodyum dodesil sülfat** (SDS) ile makromolekülleri çöktüren bir kimyasal ajan olan **trikloro asetik asitte** (TCA) saptanmıştır. Bu kimyasal ajanların yanı sıra proteaz etkinliği gösteren ajanlar (**alkalen proteaz**), kompleks karbohidrat parçalayan enzimatik ajanlar (**selülaz**, **α -amilaz**) ve hücre duvarı bütünlüğünü bozan bir ajan olan **lizozim** her bir izolat ve referans suşun biyofilmlerinin gideriminde etkinlik göstermeleri açısından dikkat çekmektedir. Hiçbir kimyasal/enzimatik ajanın muamelesi sonucunda polistiren plaka kuyularında % 100 biyomas giderimi sağlanamamıştır. Söz

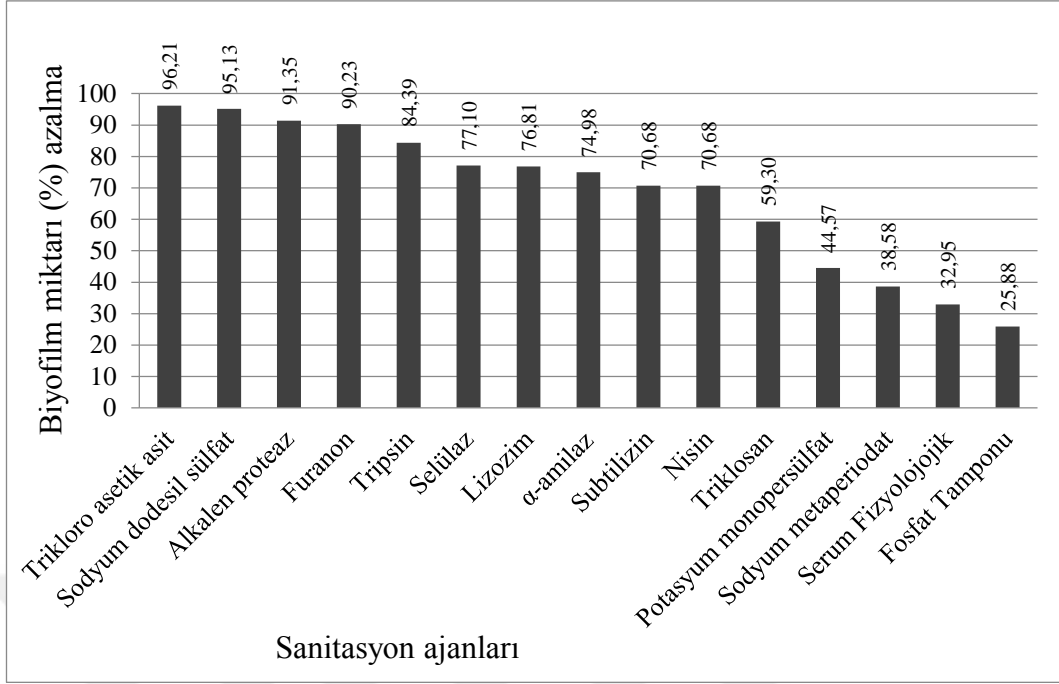
konusu çalışma, daha sonraki giderim çalışmalarını gerçekleştirebilmek için ideal sanitasyon stratejilerinin seçilebilmesi adına yapılmıştır.



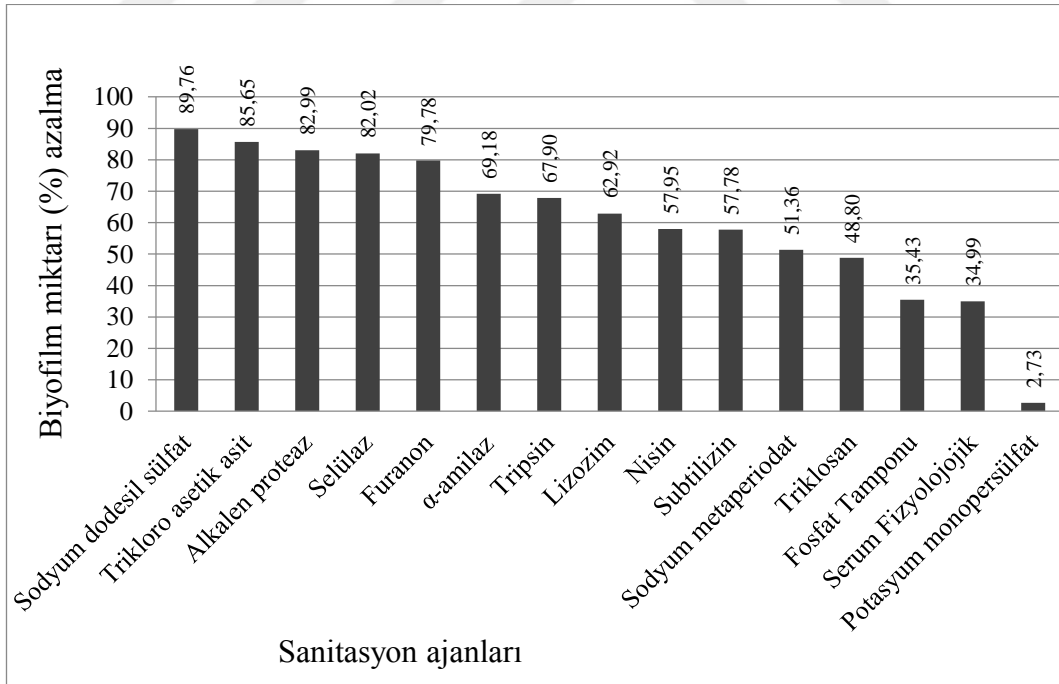
Şekil 4.67 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları



Şekil 4.68 *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları



Şekil 4.69 *G. thermodontitrificans* DSM 465^T referans suşunun biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları

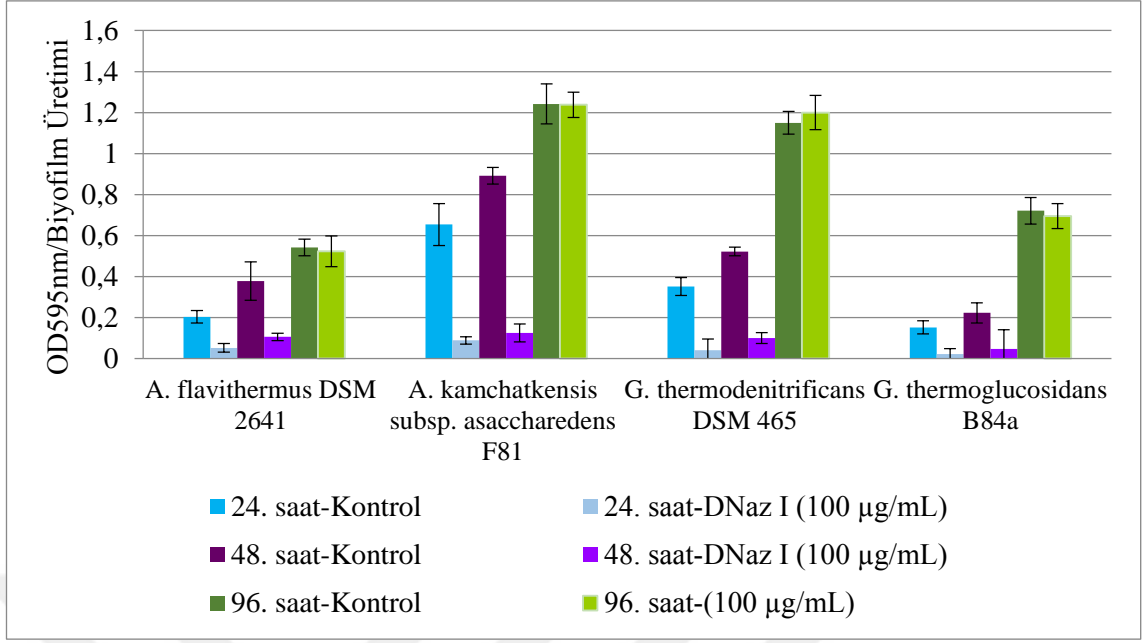


Şekil 4.70 *G. thermoglucosidans* B84a izolatının biyofilmlerinin sanitasyon ajanlarıyla giderim sonuçları

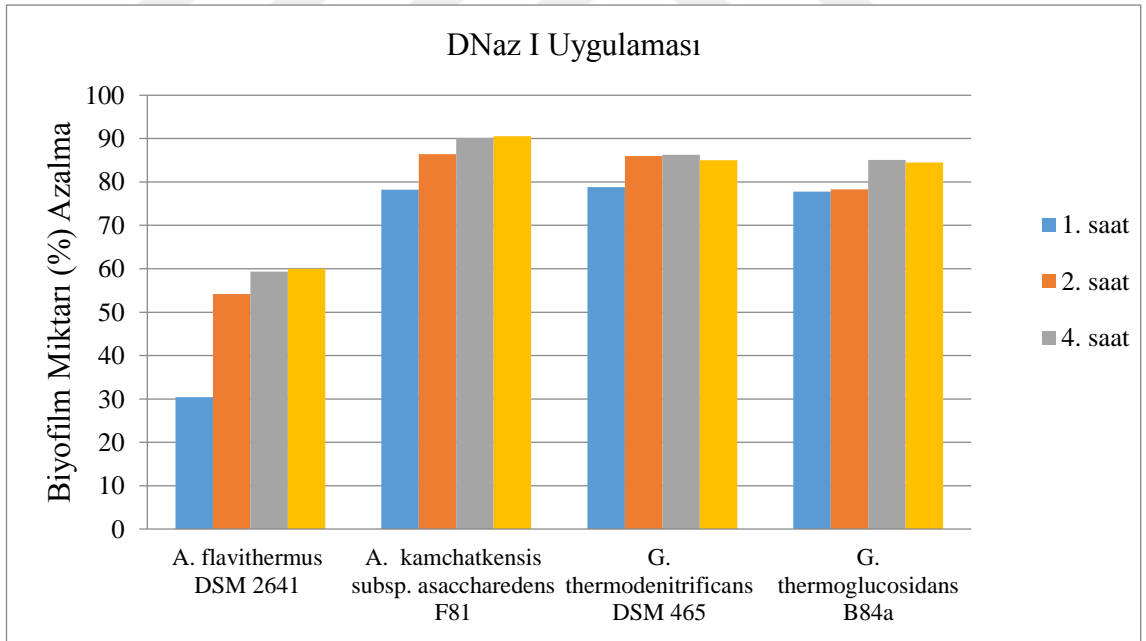
4.13 eDNA'nın termofilik basillerin biyofilmleri üzerindeki yapısal ve fonksiyonel rollerinin araştırılması

(eDNA) termofilik basillerin biyofilm üretimi üzerindeki fonksiyonelliğine bakıldığında, DNA'nın biyofilm aşaması için kritik olan ilk tutunmada oldukça önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. Zira, gelişmekte olan biyofilmlere DNaz I enzimi ile muamele edildiğinde, biyofilm üretiminde çok ciddi oranda düşüş saptanmıştır (Şekil 4.71). Söz konusu çalışma yani kültürlerin DNaz I enzimi ile ön muamelesi sütün kompleks doğasından ötürü TSB içeriklerinde gerçekleştirilmiştir (Her dört bakteri için TSB içeriği; ideal NaCl ve pH gereksinimlerine göre ayarlanmış olup 24, 48 ve 96 saat sürelerince her bakterinin biyofilm üretimi için ideal inkübasyon sıcaklıkları tercih edilmiştir. DNaz I uygulaması inkübasyondan önce yapılmıştır). DNaz I enzim muamelesinin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi saptanmamıştır.

DNaz I enziminin termofilik basillerin olgun biyofilmleri (tam yağlı süt içeriğinde, 48 saat süresince ve 60 °C'de geliştirilmiş biyofilm örnekleri) üzerindeki etkinliği değerlendirildiğinde de elde edilen bulgular çarpıcıdır. Uzun enzimatik muameleye (4 ve 12 saatlik) bağlı olarak olgun biyofilmin gideriminde % 90'lara varan bir başarı sağlanmıştır (Şekil 4.72). Her iki çalışmadan da elde edilen bulgulara dayanarak hücre dışı DNA'nın termofilik basillerin biyofilmleri üzerinde hem yapısal hem de fonksiyonel rolleri olduğu net bir şekilde söylenebilmektedir. İlgili çalışmadan elde edilen bulgulardan hareketle biyofilm matriksinde en yüksek eDNA içeriğine sahip olan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının DNaz I enzimi ile muamele edildiğinde hem biyofilm oluşumun hem de olgun biyofilminin en fazla etkilenen bakteri olduğu görülmektedir (Çizelge 4.48). Sonuçlar bu yönüyle eDNA içeriğiyle biyofilmin stabilitesi arasındaki güçlü korelasyona işaret etmektedir (Şekil 4.71 - 4.72).



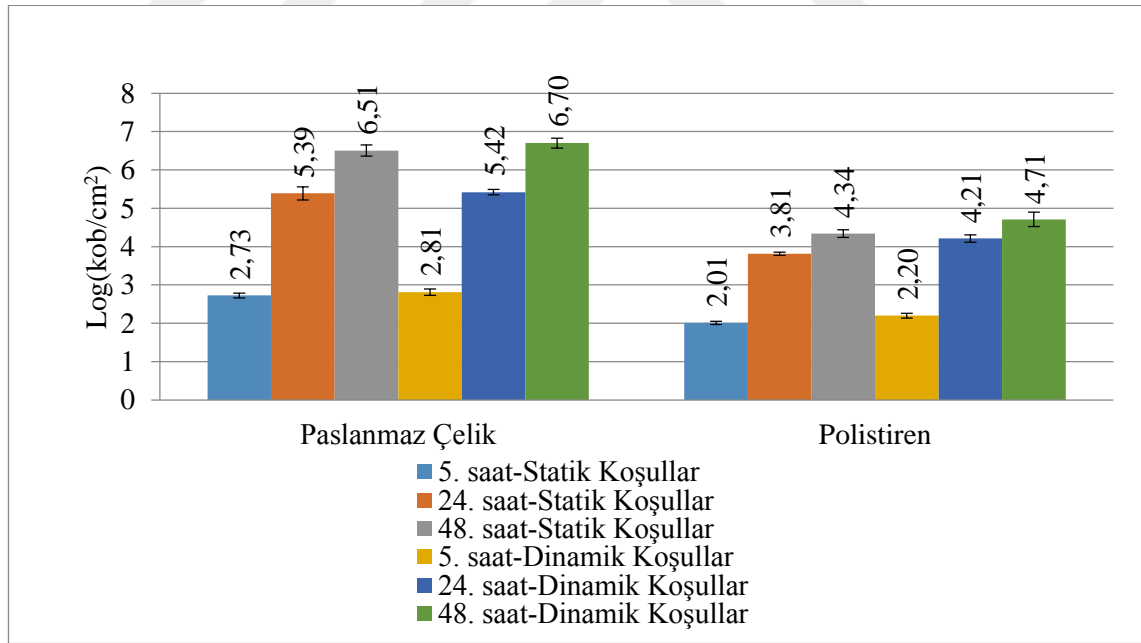
Şekil 4.71 Hücre dışı DNA'nın termofilik biyofilm oluşum başlangıcındaki rolü (Her bakteri için ideal TSB ve inkübasyon koşullarında)



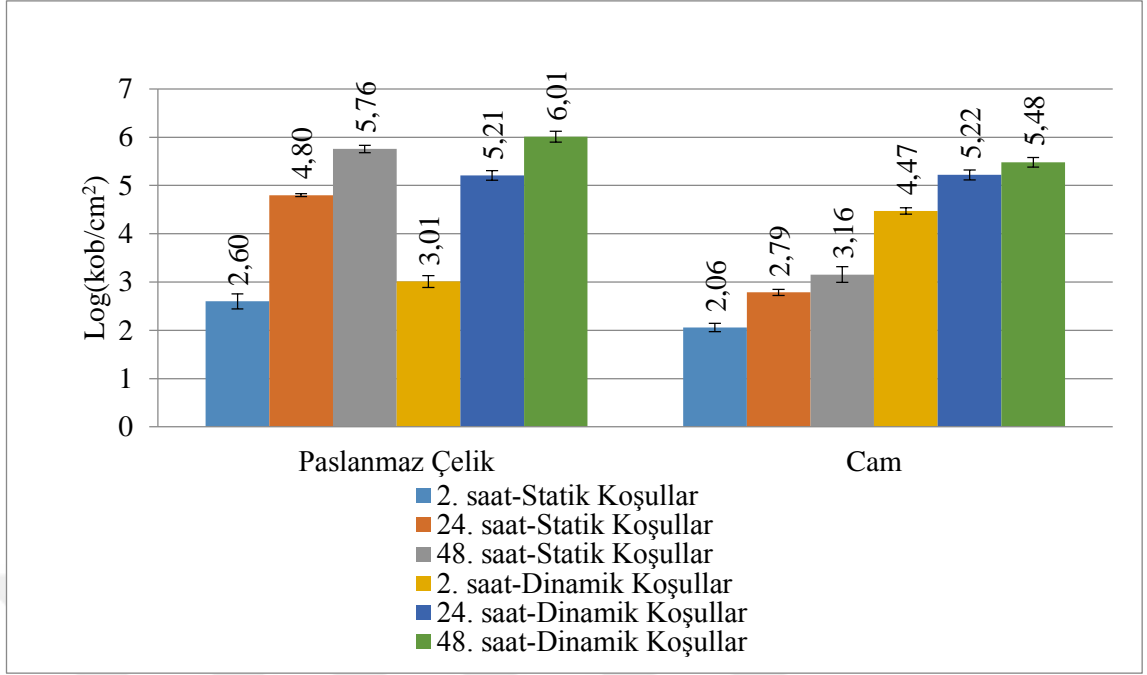
Şekil 4.72 Hücre dışı DNA'nın olgun termofilik biyofilm yapılarındaki rolü (Tam yağlı süt içeriğinde geliştirilmiş biyofilm örnekleri)

4.14 Statik-dinamik koşullarda ve süt ortamında termofilik basillerin biyofilm üretim kapasitelerinin karşılaştırılması

Referans bakteri olmaları itibariyle seçilen *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşlarının statik ve dinamik koşullarda ve tam yağlı süt içeriğinde her biri için ideal yüzeyler üzerindeki biyofilm üretim miktarlarının kıyaslaması şekil 4.73 - 4.74'te verilmiştir. Uzun inkübasyon sürelerinde (24 ve 48 saat) dinamik koşulların (170 rpm, rotasyonel akış stresi) anlamlı düzeyde biyofilm üretimine bir katkı sağladığı görülmektedir (Karşılaştırmalı T testi, p<0,05). Özetle, dinamik koşullarda ideal yüzeyler üzerinde biyofilm akümüülasyonunun artan mikrobiyal adezyona bağlı olarak daha yoğun olduğu açıktır. Süt ürünlerinin işlendiği birimlerdeki dinamik koşullar göz önünde bulundurulduğunda termofilik basillerin biyofilmlerinin neden olabilecekleri risklerde artış meydana gelmesi de söz konusu sonuçlar itibariyle son derece olasıdır.



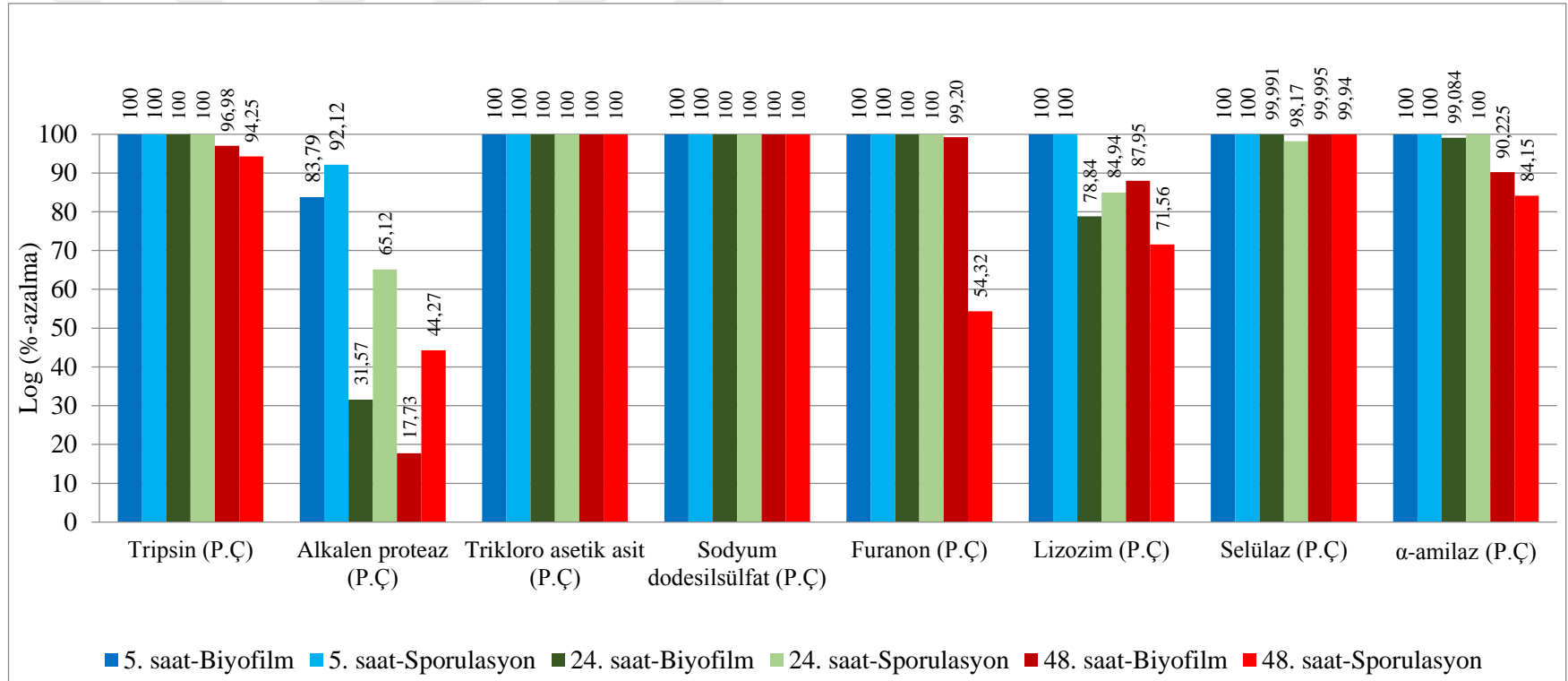
Şekil 4.73 *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun statik ve dinamik koşullardaki biyofilm üretimi



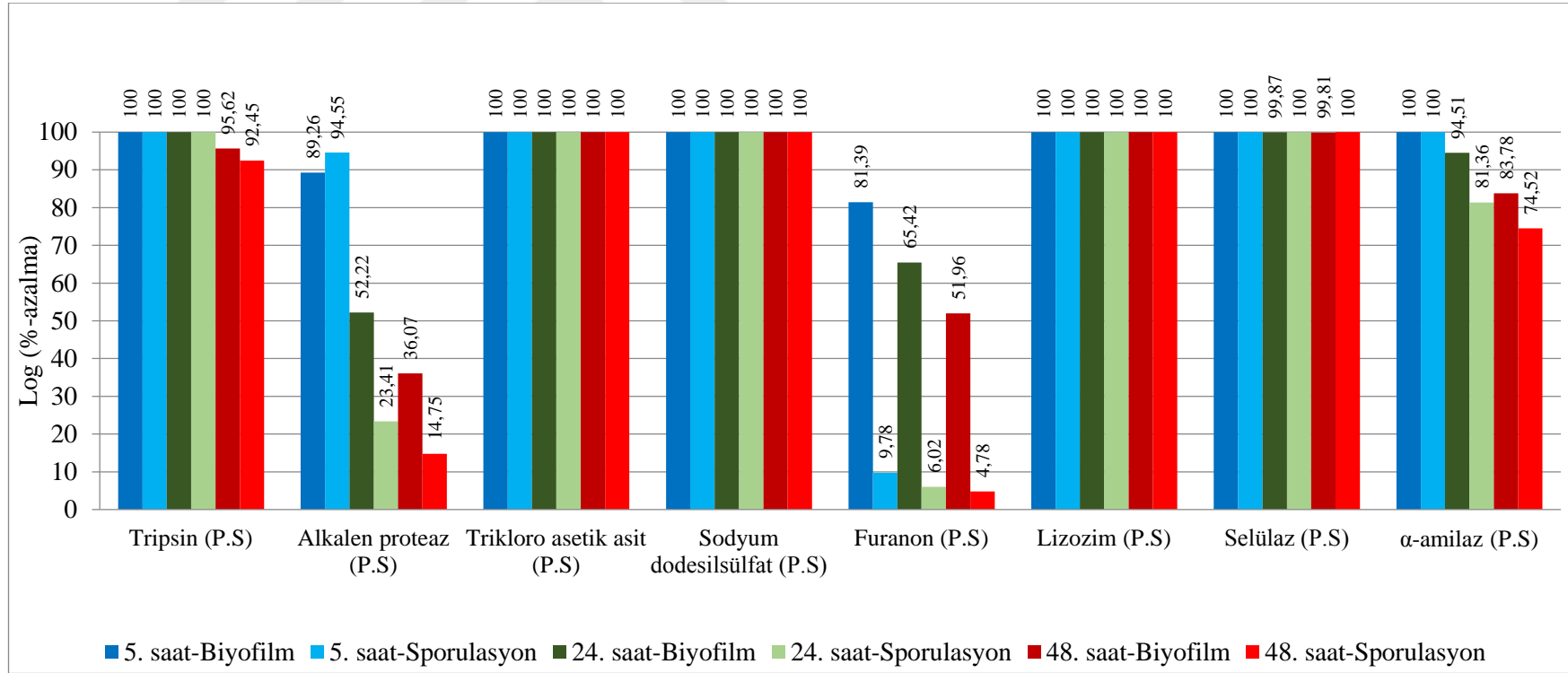
Şekil 4.74 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun statik ve dinamik koşullardaki biyofilm üretimi

4.15 Statik koşullarda ve süt ortamında geliştirilen termofilik biyofilmlerin sanitasyon işlemlerine tabi tutulması

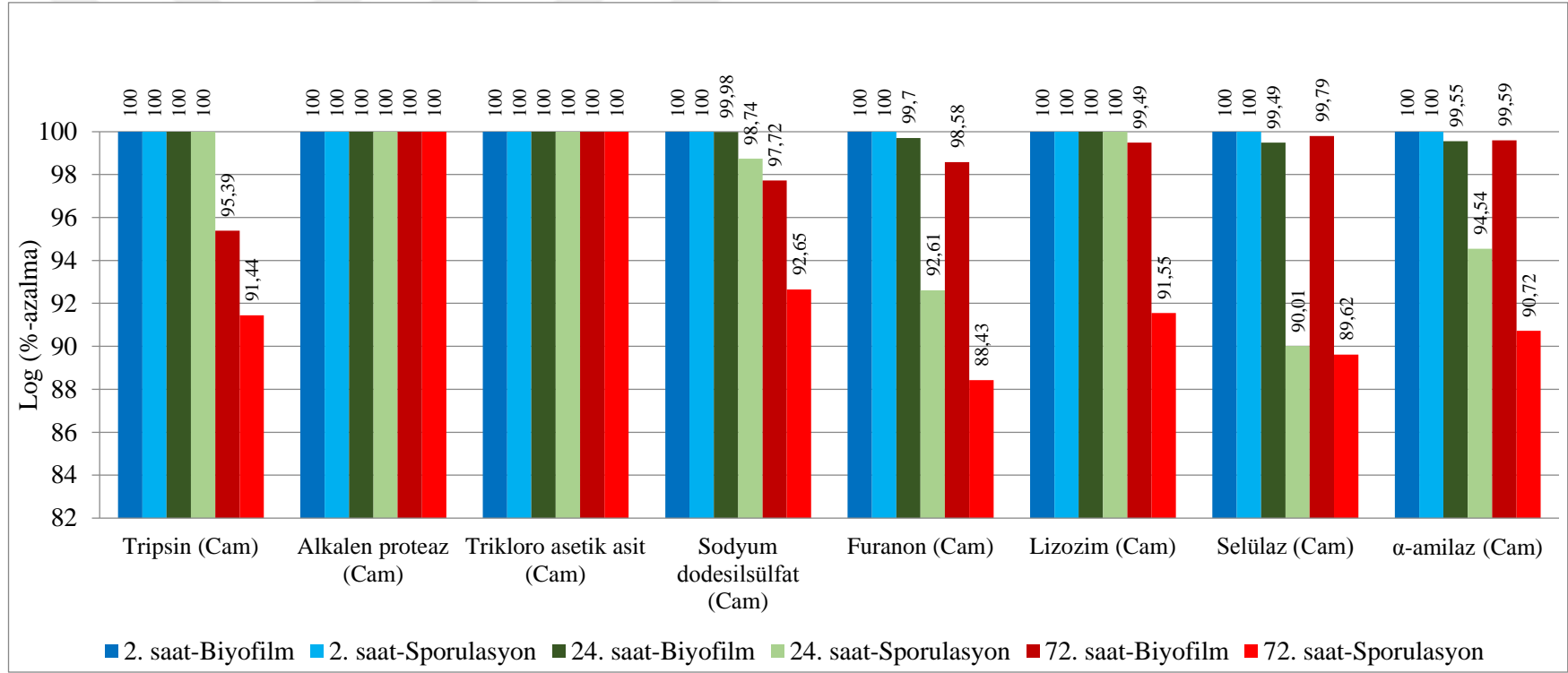
Statik koşullarda her bir referans suş için ideal yüzeylerde, koşullarda ve süt içeriğinde geliştirilen biyofilm örneklerine uygulanan sanitasyon işlemlerinin sonuçları sırasıyla şekil 4.75-4.78'de verilmiştir. Sonuçlar dahilinde her bir referans suş için kritik süreler (5., 24. ve 48. saatler *A. flavithermus* DSM 2641^T için; 2., 24. ve 72. saatler *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için) sonundaki biyofilm örneklerinin sanitasyon uygulamalarına maruz bırakılmasına bağlı olarak toplam biyofilmdeki vejetatif hücre ve spor sayım sonuçları yansıtılmaktadır. Biyofilm üretimi itibariyle söz konusu kritik süreler dikkate alındığında her bir referans suş için hem biyofilm hem de spor gideriminin biyofilm üretiminin ivme kazandığı başlangıç süreleri içerisinde (5. ve 2. saatler) tamamen gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.75 - 4.78). Söz konusu durumun tek istisnasına *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun 5 saatlik biyofilminin **alkalen proteaz** ile giderimi sonucunda rastlanmıştır.



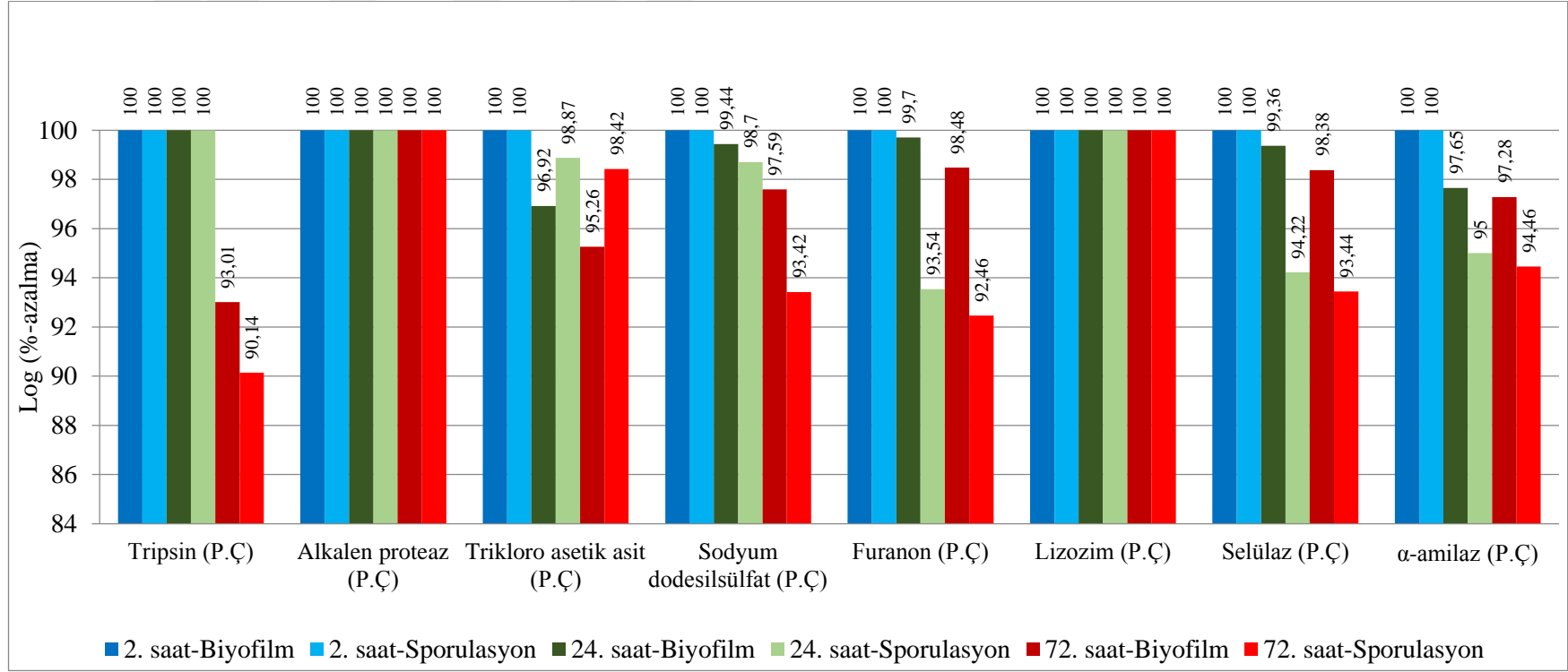
Şekil 4.75 A. flavithermus DSM 2641T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi (P.Ç; Paslanmaz çelik)



Şekil 4.76 A. flavithermus DSM 2641T şununun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi (P.S; Polistiren)



Şekil 4.77 G. thermodenitrificans DSM 465T suşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağlı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi (Cam)

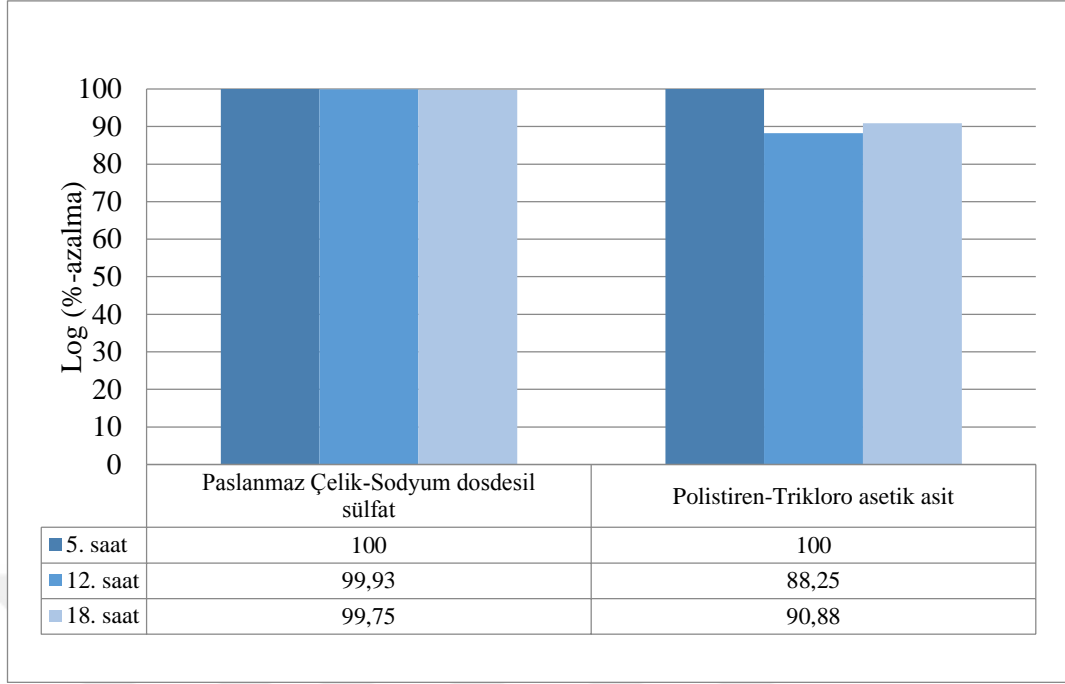


Şekil 4.78 *G. thermodenitrificans* DSM 465T şuşunun süt ortamında ve statik koşullardaki kritik inkübasyon sürelerine bağılı olarak hazırlanan biyofilm-spor örneklerinin giderimi için sanitasyon stratejilerinin değerlendirilmesi (P.Ç; Paslanmaz çelik)

4.16 *A. flavithermus* DMS 2641^T ve *G. thermodenitrificans* DMS 465^T suşlarının biyofilm üretimleri için en ideal iki abiyotik yüzeyde, dinamik koşullarda oluşturduğu biyofilmlere sanitasyon işlemlerinin uygulanması ve CLSM (Konfokal Lazer Mikroskopisi) Analizleri

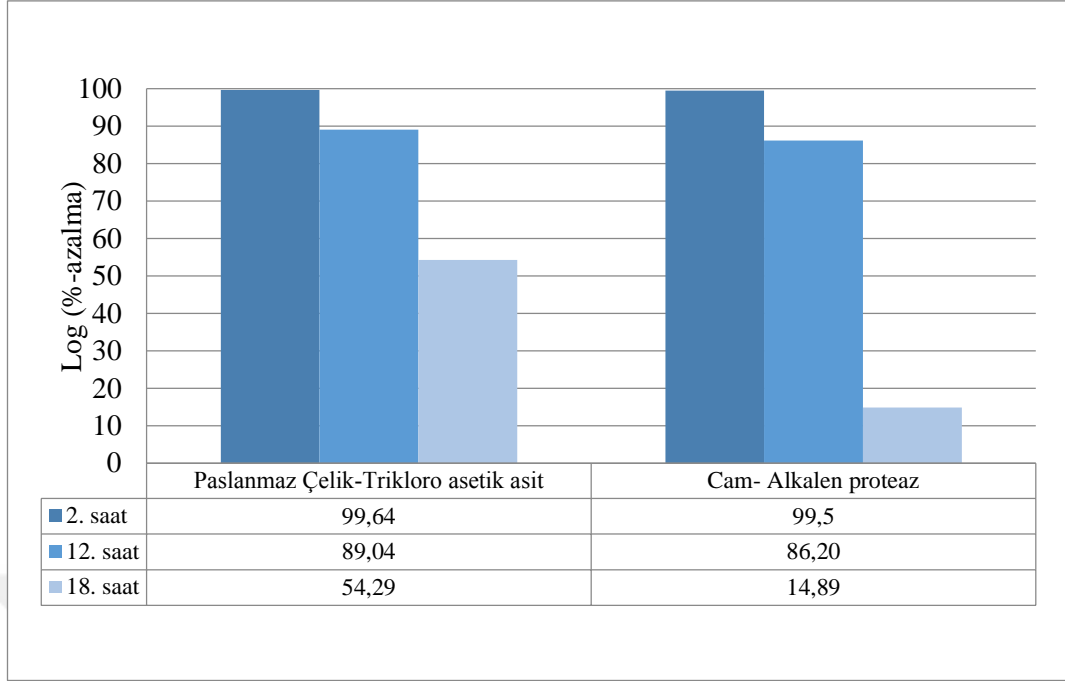
Yukarıda 4.15 başlığı altında açıklanan statik koşullardaki giderim sonuçlarına göre, canlı *A. flavithermus* DMS 2641^T biyofilm hücreleri paslanmaz çelik yüzeyden 5. saatte TCA ve SDS uygulamasıyla, polistiren yüzeyden ise 2. saatte TCA, SDS ve lizozim uygulamalarıyla tamamen giderilebilmiştir (Şekil 4.75 - 4.76). Yine 2 saatlik *G. thermodenitrificans* DMS 465^T biyofilm hücreleri, paslanmaz çelik yüzeyden proteaz ve lizozim uygulamasıyla, camdan ise proteaz ve TCA muamelesiyle % 100 canlı hücre kaybına uğratılmıştır (Şekil 4.77 - 4.78). Bu statik koşullardaki giderim sonuçları dikkate alındığında, dinamik koşullarda (170 rpm) biyofilm örnekleme her iki referans için seçilen en ideal süre kullanılarak (*A. flavithermus* DSM 2641^T için; polistiren 5. 12. ve 18. saatler, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için; 2. 12. ve 18. saatler) 60 °C'de yapılmıştır. Dinamik koşullarda iki bakteri için de belirtilen 3 kritik sürede örnekleme yapılan numuneler, sonrasında seçilen yüzeye uygun en ideal ajan ile muamele edilmişlerdir (*A. flavithermus* DSM 2641^T için; paslanmaz çelik-SDS ajanı ve polistiren yüzey-TCA ajanı ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için; paslanmaz çelik-TCA ve cam yüzey-alkalen proteaz ajanı).

Buna göre dinamik koşullarda örneklenen biyofilmlere uygulanan sanitasyon işlemlerinden elde edilen canlı hücre sayısındaki % logaritmik azalmayı gösteren giderim sonuçları şekil 4.79 - 4.80'de verilmiştir.



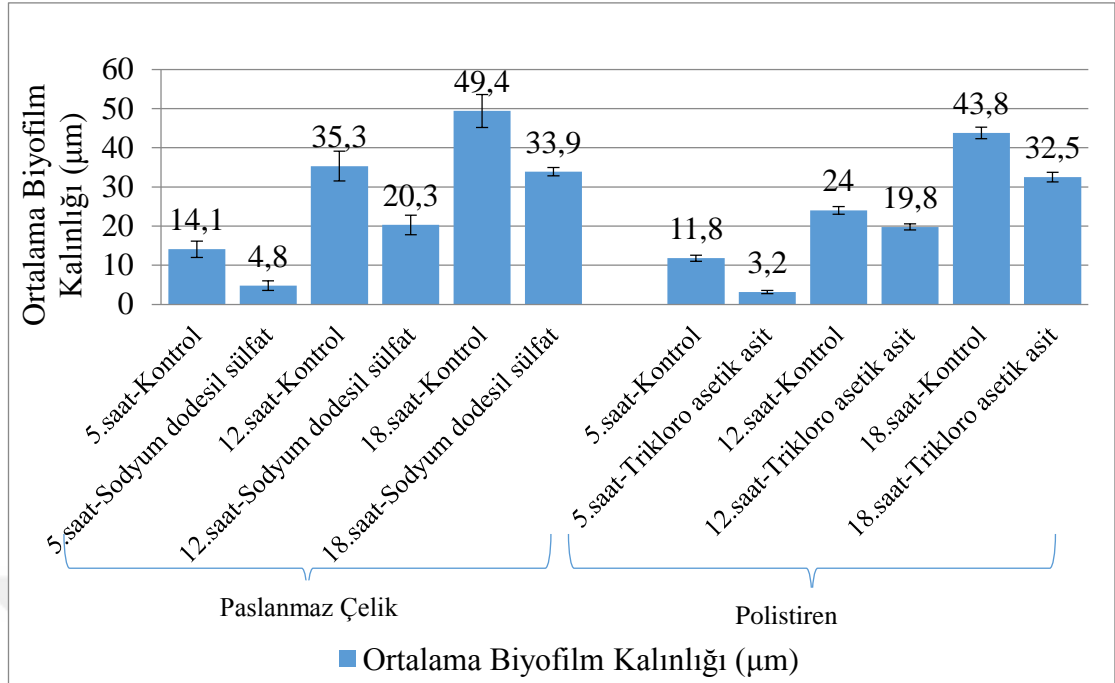
Şekil 4.79 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun farklı inkübasyon sürelerinde, süt ortamında ve dinamik koşullarda geliştirilen biyofilmlerine uygulanan sanitasyon işlemleri ve giderim sonuçları

Önceki 4.15 başlığında statik ve dinamik koşulların kıyaslandığı bulgularda olduğu üzere, her iki bakteri için yine dinamik koşullardaki hücre sayısının, daha yoğun olduğu görülmektedir. Çarpıcı şekilde, statik koşullardaki giderim sonuçlarıyla paralel olarak (Şekil 4.75, 4.76), süt ortamında paslanmaz çelikteki 5 saatlik *A. flavithermus* DSM 2641^T biyofilmleri SDS ajanı ve polistiren yüzey biyofilmleri ise TCA ile tamamen canlı hücre kaybına uğratılabılmışlardır. Dinamik koşullardaki artan hücre sayısına bağlı olarak, süre 5 saat üzerine çıktığında ise DSM 2641^T biyofilmlerinden canlı hücreler giderilememiştir (Şekil 4.79).

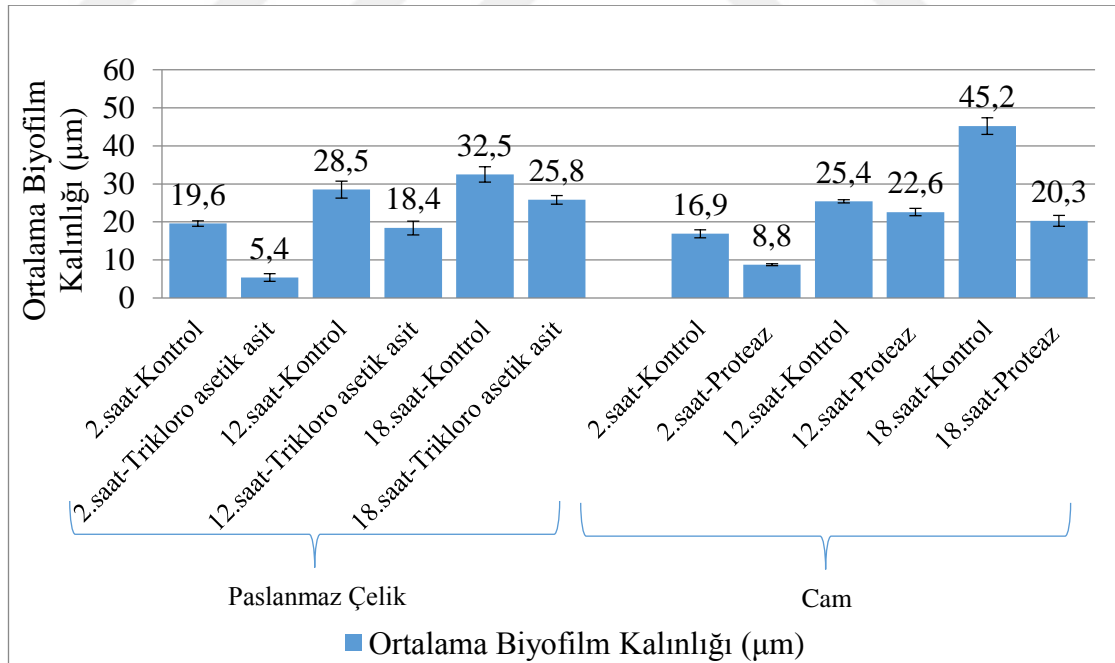


Şekil 4.80 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun farklı inkübasyon sürelerinde, süt ortamında ve dinamik koşullarda geliştirilen biyofilmlerine uygulanan sanitasyon işlemleri ve giderim sonuçları

Dinamik koşullarda ve süt ortamında üretilen *A. flavithermus* DSM 2641^T biyofilmlerinin giderim sonuçlarından farklı olarak, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun statik ve dinamik koşullardaki giderim sonuçları tam anlamıyla örtüşmemektedir. Statik koşullarda, 2 saatlik paslanmaz çelik ve cam biyofilmlerinden giderimde kullanılan TCA ve alkalen proteaz ajanlarıyla logaritmik hücre sayısında % 100 kayıp yaşanırken (Şekil 4.77 - 4.78), süt ortamındaki dinamik koşullarda, ilk iki saatte dahi bu iki yüzeyden tamamen giderim sağlanamamıştır. Paslanmaz çelik ve cam yüzeylerden giderim sonrası log % azalma miktarı % 99,6'dan fazlasına çıkamamıştır.



Şekil 4.81 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun uygulanan sanitasyon işlemleri sonucunda biyofilmlerinin değişen kalınlıkları



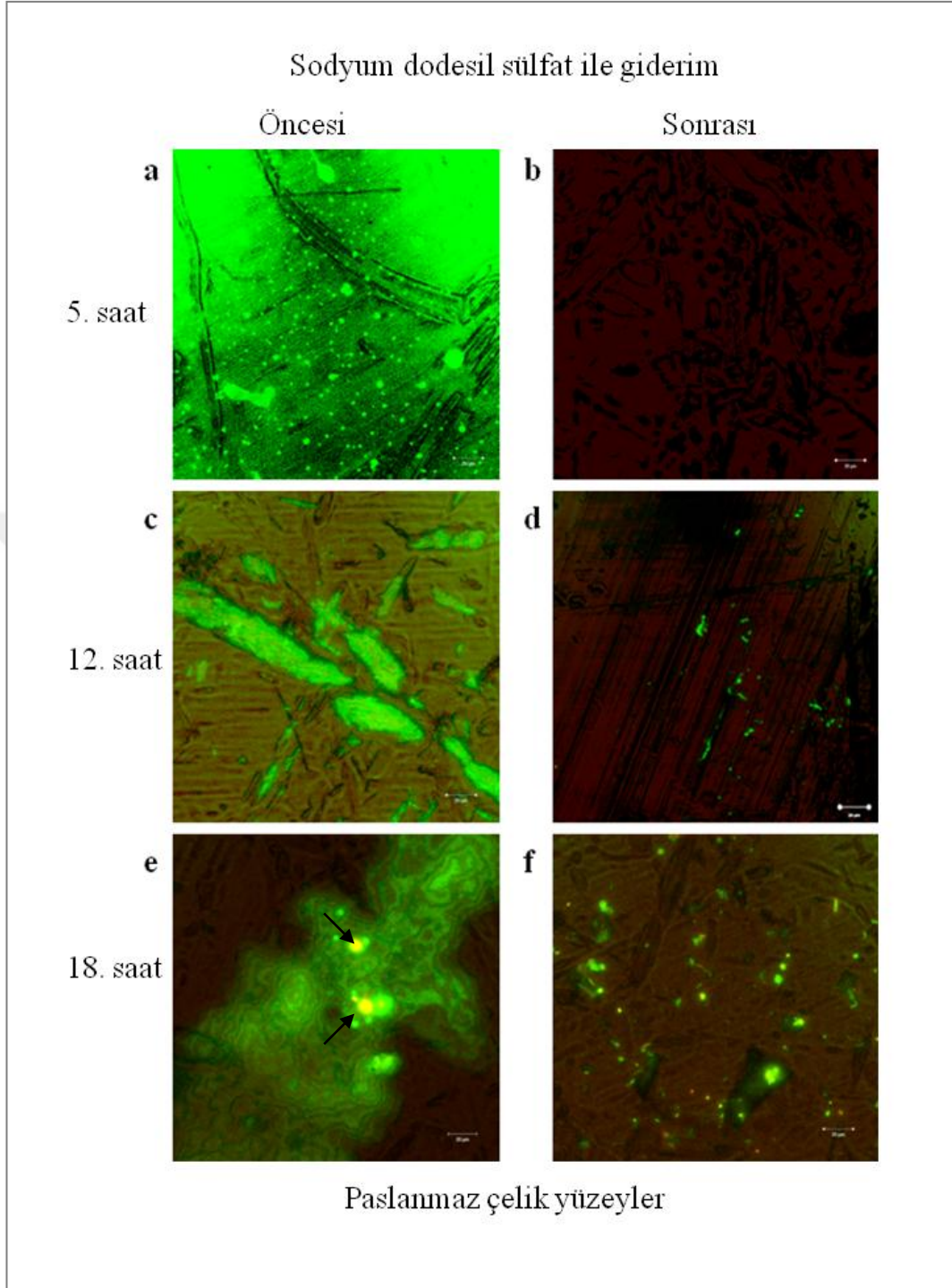
Şekil 4.82 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun uygulanan sanitasyon işlemleri sonucunda biyofilmlerinin değişen kalınlıkları

Aynı dinamik ortamdan alınan biyofilm örneklerindeki sanistasyon işlemlerine paralel olarak uygulanan Konfokal Lazer Mikroskopu sonuçları da sırasıyla şekil 4.83 - 4.86'da verilmiştir. Ayrıca, elde edilen Konfokal görüntülerinden, uygulanan sanitasyon işleminin etkinliğini değerlendirmek adına aynı zamanda biyofilm kalınlıkları da incelenmiştir (Şekil 4.81 - 4.82). Sunulan bu biyofilm kesitlerine ait görüntüler ve ölçülen biyofilm kalınlıklarına göre, hem *A. flavithermus* DSM 2641^T hem de *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun, süt endüstrisinde en sık kullanılan paslanmaz çelik yüzeyde, daha kalın ve tüm yüzeyi kaplayan belirgin biyofilmler geliştirdikleri gözlenmiştir. *A. flavithermus* DSM 2641^T'in süt ortamında 5 saatlik paslanmaz çelik ve polistren biyofilmleri, 11-14 µm ölçülmüşken, 18. saatte bu oran 44-49 µm'ye ulaşmıştır (Şekil 4.83). *G. thermodenitrificans* DSM 465^T'in süt ortamındaki 2 saatlik paslanmaz çelik ve cam biyofilmleri, 17-20 µm ölçülmüşken, 18. saatte bu oran 33-45 µm'ye ulaşmıştır (Şekil 4.85). Bu durum, *G. thermodenitrificans*'ın ilk iki saatte dahi, *A. flavithermus*'tan çok daha kalın bir biyofilm oluşturarak, süt ortamında daha ciddi riskler doğurabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, *A. flavithermus*'ta, her iki giderim ajanıyla 5 saat geliştirilen canlı biyofilm hücrelerin tamamı giderilebilse de, biyofilm kalınlığı ölçüm sonuçları, aslında bu süreçte oluşan biyofilm kütesinin giderilemediğini göstermektedir. Süt ortamındaki iki saatlik *G. thermodenitrificans* DSM 465^T biyofilm matriksinin de yine giderilemediği görülmektedir. Mevcut sonuçlar dahilinde sütteki termofilik basillerin biyofilm üretiminin yanı sıra sütün kompozisyonunda bulunan organik bileşenler (başta kazein olmak üzere) rutin besiyerlerindeki (TSB) biyofilm yapılarından çok daha kompozit ve kalın biyofilmlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda muhtemel riskleri hem oluşan termofilik biyofilmler hem de sütün doğal kompozisyonu oluşturmaktadır.

Mikroskopi analizlerinden elde edilen görüntüler, her iki termofilik bakterinin de nispeten hidrofilik karakterdeki paslanmaz çelik yüzeye çok daha iyi tutunarak, daha iyi gelişebildiklerini göstermektedir. Kullanılan diğer yüksek hidrofobik karakterdeki polistiren ve düz, yüksek hidrofilik özellikteki cam biyofilmlerinin çok daha farklı bir üç boyutlu yapıya büründükleri de dikkat çekicidir. İlk 5 saatte yeşil boyalı canlı hücre yoğunluğunun, 12 ve 18. saatlerde ise biyofilm matriksi ve ona gömülü canlı ve ölü hücrelerin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Ayrıca 12 saatte canlı hücre sayısı

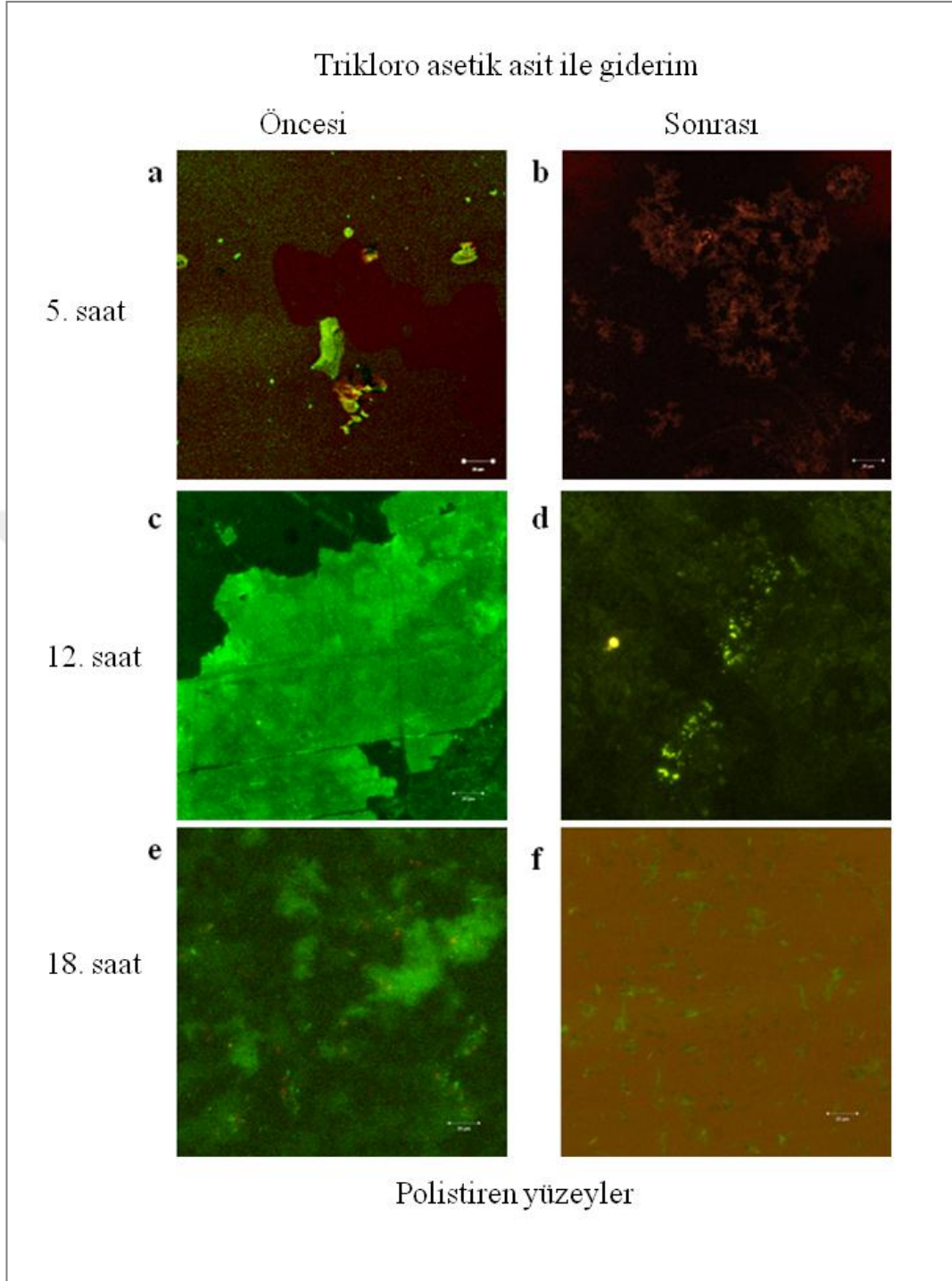
azalmaya başlayan biyofilmlerin, olgunlaşmaya başlayarak daha sıkı bir biyofilm matriksi oluşturdukları görülmektedir. 18. saatte ise olgun biyofilmin sarı ile boyanmış eDNA içerikleri oluşturdukları, ölü hücre sayısının arttığı ve bu saatte matriksin dağılmaya başladığı görülmüştür. Çalışılan termofilik basillerin hücre dışı DNA'larının genomik DNA'dan farklı bir kökene sahip olduklarının kanıtından hareketle biyofilmlerin olgunlaşmasıyla birlikte ilerleyen safhalarda hücre dışı ortama yoğun bir şekilde hücre dışı DNA salgılandığı görülmektedir.





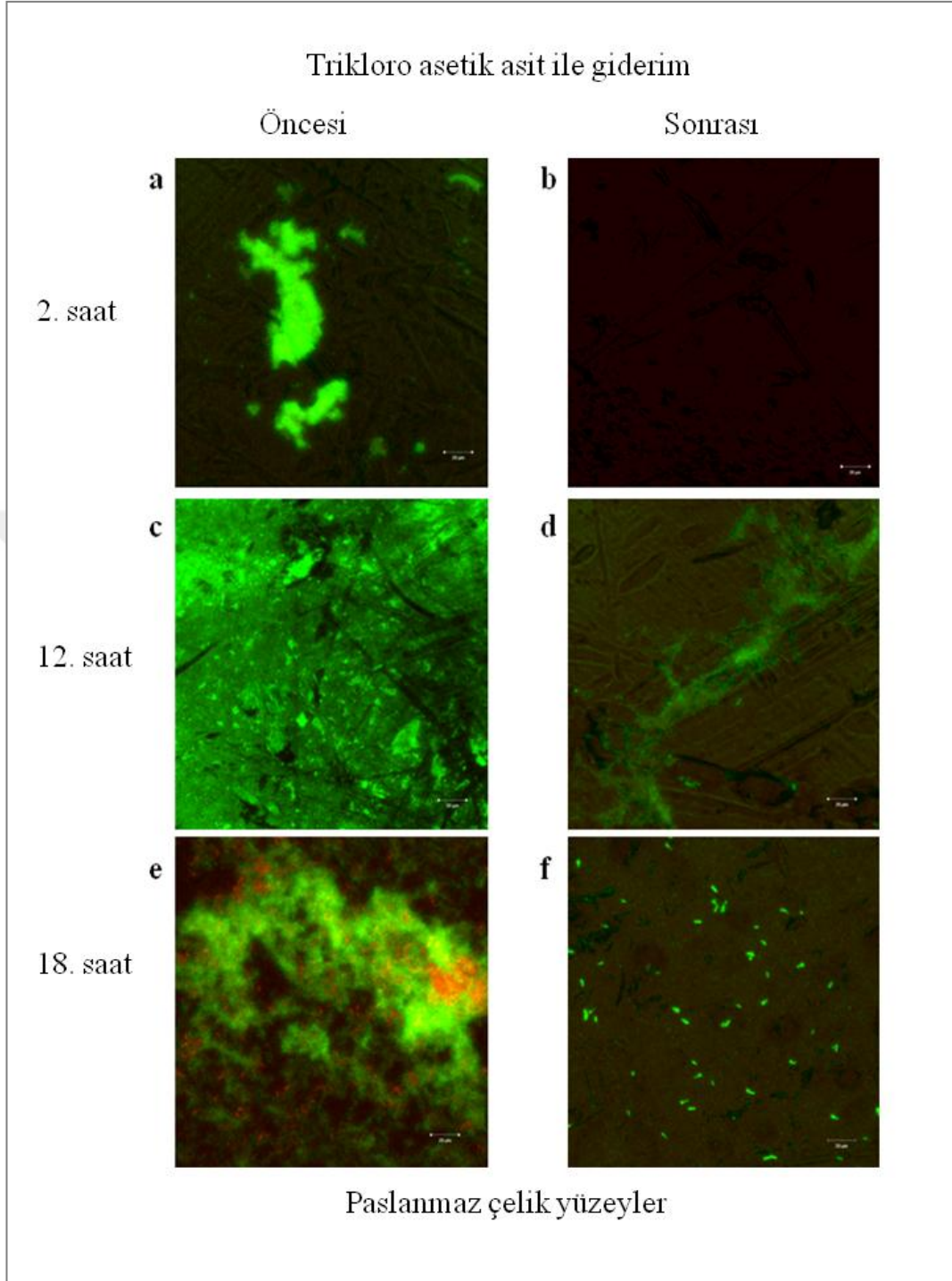
Şekil 4.83 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun paslanmaz çelik yüzeylerde sodyum dodesil sülfat uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopi’nda incelenen biyofilm örnekleri

a). 5 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), b. 5 saatlik test örneği (ajan uygulanan), c. 12 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), d. 12 saatlik test örneği (ajan uygulanan), e. 18 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), oklar hücre dışı DNA’nın varlığına işaret etmektedir f. 18 saatlik test örneği (ajan uygulanan).



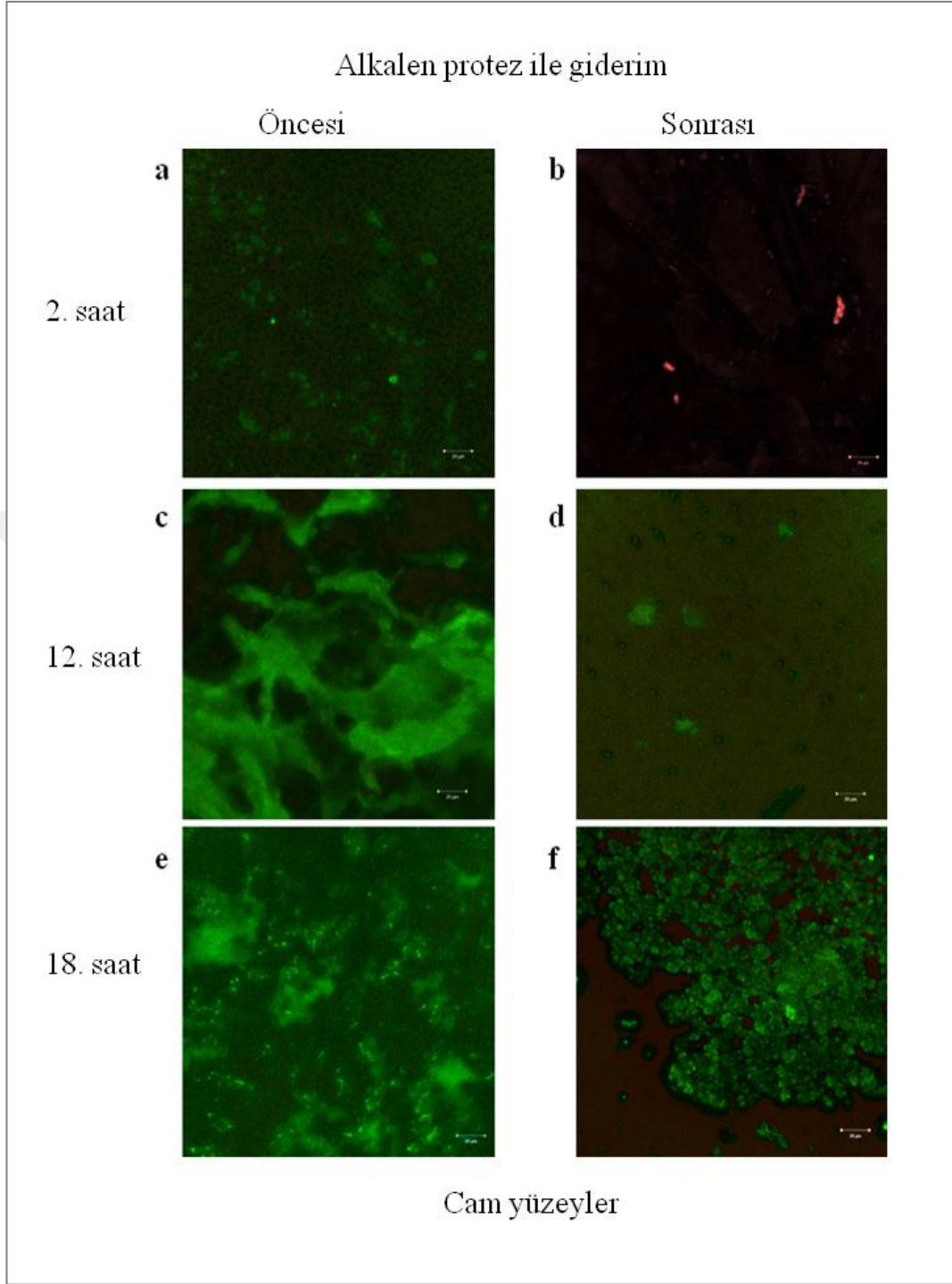
Şekil 4.84 *A. flavithermus* DSM 2641^T referans suşunun polistiren yüzeylerde trikloro asetik asit uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri

a. 5 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), b. 5 saatlik test örneği (ajan uygulanan), c. 12 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), d. 12 saatlik test örneği (ajan uygulanan), e. 18 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan), f. 18 saatlik test örneği (ajan uygulanan).



Şekil 4.85 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun paslanmaz çelik yüzeylerde trikloro asetik asit uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri

a. 2 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) b. 2 saatlik test örneği (ajan uygulanan) c. 12 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) d. 12 saatlik test örneği (ajan uygulanan) e. 18 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) f. 18 saatlik test örneği (ajan uygulanan)



Şekil 4.86 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşunun cam yüzeylerde proteaz uygulanması sonucunda Konfokal Lazer Mikroskopu'nda incelenen biyofilm örnekleri

a. 2 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) b. 2 saatlik test örneği (ajan uygulanan) c. 12 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) d. 12 saatlik test örneği (ajan uygulanan) e. 18 saatlik kontrol örneği (ajan uygulanmayan) f. 18 saatlik test örneği (ajan uygulanan)

Şekil 4.83 - 4.86 arasında süt ortamındaki yüzeylerden biyofilm giderimi öncesi ve sonrası elde edilen konfokal kesitleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, *A. flavithermus* DSM 2641^T için öngürülen 5 saatin ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T referans suşu için ise 2 saatin sonrasında, biyofilmdeki canlı hücrelerin olgunlaşmaya bağlı olarak kullanılan ajanlara rağmen giderimlerinin çok ciddi riskler doğurabilecekleri ve 2 saatlik bir süre zarfında dahi ciddi bir canlı biyofilm yoğunluğuna ulaşabildikleri gösterilmiştir. Özellikle, *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunda 5 saat sonunda her ne kadar biyofilmdeki tüm canlı hücreler giderilebilse de, biyofilm kütlelerinin tamamen giderilememesi de, yine bu ölü hücre içerikli matrikse yeni hücrelerin tutunarak biyofilm oluşumunu tetikleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca en ideal oldukları saptanan bu dört farklı ajanın tamamının da, biyofilm matriksinin protein içeriğine etki etmesi de dikkat çekicidir. Bu da biyofilm matriks bileşeni olarak protein içeriğinin, biyofilmin bütünlüğüne ciddi katkı sağladığına işaret etmektedir.

Sonuç olarak, sanitasyon uygulamalarına bağlı olarak eş zamanlı yürütülen sayım ve mikroskopi çalışmalarının sonuçları birbirleriyle paralellik göstermektedir. Zira erken safha biyofilm örneklerinin farklı ideal yüzeylerde seçilen sanitasyon işlemiyle bütünüyle giderimi mümkün olurken, kritik safhanın aşılması durumunda süt endüstrisinde termofilik basillerin eliminasyonu için tavsiye edilen söz konusu sanitasyon işlemleri sonuç vermemektedir. Bu bağlamda süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde, termofilik basilin biyofilm üretiminin ivmelenmeye başladığı süreç öncesinde rutin sanitasyon prosedürlerinin uygulanması önem arz etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ozmolarite, herhangi bir solüsyonda ozmotik olarak çözünen partiküllerin konsantrasyonunu ifade etmektedir. Besiyerinin ozmolaritesinin modifiye edilmesinde NaCl (sodyum klorür) sıklıkla tercih edilen bir ozmolittir (O'Toole ve Kolter 1998). Yüksek ozmolarite başta *E. coli*, *Salmonella* ve *Pseudomonas* olmak üzere birçok Gram-negatif bakterinin abiyotik yüzeyler üzerinde tutunmasını ve biyofilm üretimini inhibe etmektedir (O'Toole ve Kolter 1998, Houdt vd. 2005, Karaca vd. 2013). Düşük ozmolarite gibi çevresel bir sinyal dahilinde gelişen membran stres yanıtı ve bu yanıtın düzenlenmesinden sorumlu kompleks regülatör ağlarının devreye girmesi, Gram-negatif bakterilerde flagella ve fimbriya gibi biyofilm oluşumunun başlangıcı için kritik önemi olan hücre dışı yapıların biyosentezini artırmaktadır (Jubelin vd. 2005). Başta *S. aureus* olmak üzere bazı Gram-pozitif bakterilerde artan tuz konsantrasyonu ile ilişkili ozmotik stres biyofilm yanıtından sorumlu genetik determinantların ifadelerinin düzenlenmesinden sorumlu, global stres yanıtıyla ilişkili alternatif sigma faktörlerinin devreye girmelerine neden olarak biyotik ya da abiyotik yüzeyler üzerinde daha kompakt yapıda biyofilmlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Rachid vd. 2000). Biyofilm yaşam moduna geçişte başta ozmolarite olmak üzere global stres yanıtına ilişkin kompleks regülasyon ağlarının yeniden düzenlenmesine yönelik literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Tez çalışmasında ozmolaritenin termofilik basillerin biyofilm üretimlerine olan etkisini belirlemek adına polistiren yüzeylerde çok sayıda *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* referans suş/izolatın taraması yapılmıştır. Tezin başlangıç sürecini temsil eden bu çalışmada ileriki çalışmaları devam ettirebilmek adına biyofilm üreticisi referansların ve izolatların seçimi hedeflenmiştir. Bu bağlamda biyofilm örnekleme için düşük ozmolariteli (NaCl ihtiva etmeyen TSB) ve standart TSB (NaCl ihtiva eden) besiyerleri tercih edilmiştir. Bu aşamada kesinleştirilmesi istenen bir diğer durum, daha sonraki çalışmaları yürütürken biyofilm çalışmalarından önce ön aktifleştirme sürecine yönelik sürekli kullanılabilir bir prosedür belirlemektir.

Besiyeri içeriğindeki tuzun biyofilm üretim miktarı üzerinde cins düzeyinde belirleyici olmadığı görülmektedir (Şekil 4.2, 4.4, Çizelge 4.2, 4.3). Ancak, çalışmaya dahil edilen tüm izolat ve referans suşlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde ozmolaritenin tür düzeyinde

belirleyici olabileceği anlaşılmaktadır. Besiyeri ozmolaritesinin her ne kadar *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi üyelerinin geneli ele alındığında biyofilm üretim davranışları üzerinde belirleyici bir etkisi olmadığı görülse de, seçim işlemi tamamlandıktan sonra (iyi biyofilm üreticisi suşlar ve izolatlar) her bir izolat ve referans suşun ideal düzeyde biyofilm üretebilmesi için daha sonrasında gereksinim duyacağı tuz içeriği dikkate alınarak örnekleme yapılmıştır. Biyofilm çalışmalarında, özellikle üretici suşların saptanması için, ön inokülasyon prosedürlerinin doğru bir şekilde belirlenecek olması üretici suşların bundan sonraki çalışmalarda da doğru ve güvenilir bir şekilde seçilebilmesi adına önem arz etmektedir. Tezin başlangıcında gerçekleştirilen genel tarama işlemi termofilik basiller söz konusu olduğunda ideal inokülasyon prosedürünün suşun ya da izolatın gereksinimine göre belirlenmesi gerektiğini kesin olarak ortaya koymaktadır. Yine elde edilen bulgular dahilinde ozmolariteyle ilişkili çevresel sinyallerin termofilik basillerin biyofilm üretim davranışları üzerinde çok çeşitli düzeyde etkili olabileceğini göstermektedir. Çalışılan termofilik basillerin biyofilm üretim yanıtlarının ozmolariteye bağlı değişimi oldukça heterojen bir profil göstermektedir.

Sıcaklık bir mikroorganizmanın üremesini ve yaşamını sürdürebilmesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerin başında gelmektedir. Organizmanın üreyebildiği asgari, optimum ve azami kardinal sıcaklık aralıkları mevcuttur. Mikrobiyal yaşam, suyun kaynama sıcaklığına kadar, hatta bu sıcaklığı da içine alan çok daha yüksek sıcaklıklarda varlığını sürdürebilmektedir. Bu yüksek sıcaklıkların hakim olduğu ortamları, doğada termofilik basillerin de dahil olduğu sadece belirli türler habitat olarak seçebilirler. 45-80 °C aralığındaki sıcaklıklarda vejetatif formda gelişebilen termofilik basiller, endospor oluşturarak 110 °C'ye kadarki sıcaklıklarda hayatta kalabilmektedirler. Bu nedenle, termofilik basiller termal adaptasyonlarının yanı sıra, endospor ve biyofilm oluşturmaları sebebiyle dünya üzerinde pek çok habitatdan izole edilebilmişlerdir. Termofilik basiller sadece doğal habitatlardan değil, insan yapımı pek çok çevreden de izole edilebilmektedirler. İnsan yapımı habitatları arasında: yüksek sıcaklıkta enerji üretilen endüstriyel ortamlar ve kömür yığınlarının üst üste yığıldığı enerji üretilen bölgeler, termik santrallerdeki paslanmaz çelik borular, yer altından jeotermal su çıkışının sağlandığı sıcak su sondaj borularının iç yüzeyleri, süt ile süt

ürünlerinin, meyve sularının, glukoz şuruplarının yapımında kullanılan ve çoğunlukla paslanmaz çelikten imal edilen büyük ölçekteki endüstriyel fermentörler bunların başlıcalarıdır (Nazina vd. 2000, Vieille ve Zeikus 2001). *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerinin üyeleri zorunlu termofiller olup, çoğunlukla 40–68 °C gibi yüksek sıcaklık aralıklarında gelişebilmektedir (Flint vd. 2001c, Ronimus vd. 2003). Başta süt ve süt endüstrisi olmak üzere, meyve suyu pastörizasyonu, konserve, kağıt, şeker rafinesi, kuru sebze ve meyve üretimi, jelatin üretimi gibi işlemleri içeren endüstriyel süreçlerde yüksek sıcaklık uygulamaları, termofilik basillerin gelişip çoğalmalarına imkan sağlayarak, ürettikleri spor/biyofilmler ile ilişkili sürekli kontaminasyonlara neden olmaktadır (Denny 1981, Hayes 1985, De Clerck vd. 2004b, Jay vd. 2005, Chen vd. 2006, Scott vd. 2007). Artan termal stres termofilik basillerde spor oluşumunu teşvik eden en önemli çevresel faktörlerin başında gelmektedir. Termofilik basillerin biyofilm üretimleri, hem vejetatif hücrelerin hem de sporların yüzeye tutunmalarıyla başlayan bir süreçtir. (Flint vd. 2001a, Parkar vd. 2001). *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* üyelerinin sporlarının, vejetatif hücrelerine nispeten paslanmaz çelik abiyotik yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde oldukları daha önceki literatür çalışmalarında kanıtlanmıştır (Flint vd. 2001a, b, Scott vd. 2007, Burgess vd. 2009, Kilic vd. 2017). Söz konusu literatür çalışmalarında düşük sıcaklıklarda *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* üyelerinde sporulasyon sürecinin düşük sıcaklıklarda (48 °C) baskılandığı görülmektedir. Sporulasyon miktarındaki düşüşe bağlı olarak biyofilm üretiminde de düşüş görülmektedir.

Tezin bu aşamasında biyofilm üretimi üzerinde iki kritik sıcaklığın etkisi araştırılmıştır: 55 °C gibi bu iki cinse üye bakterilerin ideal düzeyde gelişebildiği bir inkübasyon sıcaklığı ve termal stresi yansıtabilmesi itibarıyla 65 °C'lik bir inkübasyon sıcaklığı. Çalışma dahilindeki *Geobacillus*'un tüm üyeleri artan termal strese (65 °C) 55 °C'ye nispeten çok daha yoğun düzeyde biyofilm üretimi göstermiştir. *Anoxybacillus* cinsine dahil üyelerde ise cins düzeyinde inkübasyon sıcaklığının biyofilm üretimi üzerinde belirleyici olmadığı ancak; suş ve izolat düzeyinde iki farklı sıcaklıktada yüksek düzeyde biyofilm üretebilen suş ve izolatların varlığına rastlanmıştır (Şekil 4.5 - 4.8). İnkübasyon sıcaklığının genel olarak biyofilm üretimi üzerine olan etkisi dikkate alındığında, başta *Geobacillus* üyeleri olmak üzere, yükselen sıcaklığın sporulasyon

miktarını artırmasına bağlı olarak termofilik basillerin yzeylere daha fazla tutunmalarına ve dolayısıyla daha fazla biyofilm üretmelerine imkan sağladığı söylenebilmektedir. Uzayan inkübasyon süresinin de artan açlık açlık stresi ve bu durumla ilişkili artan sporulasyona bağlı olarak her iki cinsin tüm üyeleri için biyofilm üretimini artıran bir faktör olduğu kesindir.

Biyofilm üretim davranışlarını belirlemek adına birincil tarama işlemi, temel çevresel parametlerin (sıcaklık, ozmolarite ve inkübasyon süresi) etkileri, ilk etapta TSB içeriğinde ve polistiren mikrotitre plaka yzeylerinde yapılmıştır. Bu çalışma *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsine üye çok sayıda ve çeşitte izolat ve referansın biyofilm üretimleri için temel fizyolojik gereksinimlerin saptanabilmesi adına oldukça faydalı bilgiler sağlamıştır. Ancak tezin yönelttiği soruların yanıtlanabilmesi, ileri çalışmaların yürütülebilmesi ve bu iki cinse üye bakterilerin biyofilm üretim davranışlarının süt içeren ortamlarda daha gerçekçi bir senaryo ile belirlenebilmesi için ilk aşamadaki tarama işlemi, yine iki kritik inkübasyon sıcaklığında (55 °C ve 65 °C), polistiren yzeylerde, ancak standart tam yağlı süt içeriğinde gerçekleştirilmiştir. İki inkübasyon sıcaklığında polistiren yzeylerde çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan *Geobacillus* üyeleri “güçlü” biyofilm üretim karakteristiği sergilememiştir. Yine bir önceki çalışmada olduğu üzere artan termal stres genel olarak biyofilm üretim miktarında bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.5 - 4.6). Önceki taramadan farklı olarak tam yağlı süt içeriğinde *Anoxybacillus* üyelerinin önemli bir kısmında “güçlü” biyofilm üretim karakteristiği görülmüştür (Şekil 4.7). Mevcut bulgular ile literatürde bulgular arasında bu bağlamda bir ilişki kurulabilmektedir. Zira başta süt tozu işleme üniteleri olmak üzere süt ürünlerinin işlendiği ünitelerden *Anoxybacillus* üyeleri, *Geobacillus* üyelerine oranla çok daha sık izole edilmektedir (Ronimus vd. 2003, Yuan vd. 2012). Hatta mevcut termofilik basil türleri arasında bu ortamlardan en sık izole edilen türlerin başında *A. flavithermus* gelmektedir (Yuan vd. 2012). Bu bilgilerden hareketle *Anoxybacillus* üyelerinin süt içeren ortamlarda biyofilm üretimine daha eğilimli oldukları ve bu karakteristiklerine bağlı olarak bu ortamlarda daha uzun süre varlıklarını sürdürebildikleri düşünülebilir. Mevcut tez çalışması kapsamında *Anoxybacillus* üyelerinin süt içeriğinde daha fazla düzeyde biyofilm üretebilmeleri de mevcut fenomenle ilişkilendirilebilmektedir.

Ayrıca bu çalışmada ele alınan yöntemsel yaklaşım literatürdeki önemli bir açığı kapatabilecek mahiyettedir. Literatürde biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi için önerilen rutin 96 kuyuluk polistiren mikrotitre plakalarda uygulanan kristal viyole bağlanma yöntemi, ilk kez tam yağlı süt içeriğinde oldukça geniş bir termofilik basil kolleksiyonundaki üyelerin süt içeriğindeki biyofilm üretim davranışlarını belirlemek üzere değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem dahilindeki tek handikap inkübasyon süresinin, yüksek sıcaklıklarda, mümkün mertebe kısa tutulması gerektiğidir. Zira yükselen sıcaklıklarda, sütün içerisindeki “whey” proteinleri denatüre olarak yüzeylere yapışmaktadır (Marchand vd. 2012) ve bu durum da kristal viyole boyasının biyofilm matrisine bağlanmasının esas alındığı yaklaşımlarda hatalı sonuçlara sebep olabilmektedir. Tez sürecinde geliştirilen bu yöntemsel yaklaşım, çok sayıda termofilik basilin kısa sürede ve istikrarlı bir şekilde süt ortamında biyofilm üretim karakteristiklerini belirleyecek niteliktedir ve bu yönüyle bir ilke karşılık gelmektedir.

Sütün iki majör bileşeni olan kazein ve laktozun termofilik basillerin biyofilm üretimine olan etkilerini araştırmak ve bu bileşenlerin metabolize edilmeleri sonucunda biyofilm üretim yanıtlarında meydana gelecek olası değişimleri anlamak adına çalışmaya dahil edilen tüm *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyelerinin laktozu fermente edebilme ve kazeini hidrolize edebilme özellikleri belirlenmiştir. Süt komponentlerinin termofilik basillerin biyofilm üretim davranışlarına yönelik etkilerinin değerlendirildiği literatür çalışmalarında, çoğunlukla bu komponentlerin paslanmaz çelik yüzey gibi yüzeylerin yüzey yük karakteristiğini nasıl değiştirdiğine ve bunun sonucunda bakteriyel tutunma paternlerinin nasıl etkilediğine odaklanılmıştır (Bemborn vd. 2009). Süt bileşenlerinin florada ya da sütün işlendiği ortamda bulunabilecek mikroorganizmaların yüzeylere tutunmalarını ve biyofilm üretim kabiliyetlerini çok çeşitli yollarla etkilediğine yönelik raporlar mevcuttur. Örneğin; *Pseudomonas* gibi çiğ sütün normal florasında bulunabilecek bir bakterinin, sütün içeriğindeki şeker ve protein içeriğinin artırılmasıyla biyofilm üretim kapasitesinin paslanmaz çelik yüzeylerde azaldığı belirtilirken (Bemborn vd. 2009), seyreltilmiş süt içeriğinde termofilik basillerin sporlarının ve vejetatif hücrelerinin tutunma kapasitelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Parkar vd. 2001). Organik tabiattaki süt bileşenleri (kazein, laktoz) *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi önemli süt patojenlerinin de paslanmaz çelik yüzeylere tutunma kapasitelerini

düşürmektedir. Çalışmadaki termofilik basillerin laktozu fermente edebilme ve kazeini hidrolize edebilme gibi fenotipik karakteristiklerinin de belirlenmesi ve seçilecek üyelerde önemli bir kriter olarak dikkate alınması, bu bileşenlerin metabolize edilmelerine ya da edilememelerine bağlı olarak biyofilm oluşturma sürecinin nasıl etkilendiğini kavramaya yönelik olmuştur. Bu sorunun yanıtlanmasına ilave bir diğer durum da, süt ortamında bulunabilecek çok çeşitli sayıda türe üye bakteriler arasında laktozu fermente edebilenler ile edemeyenlerin bir arada bulunmaları ihtimalinin yüksekliğidir. Zira laktozun fermente edilmesi ve kazeinin hidrolize edilmelerine bağlı olarak açığa çıkan metabolitler bu bileşenleri fermente edemeyen veya hidrolize edemeyen diğer bakterilerin gelişip çoğalmalarına imkan sağlayacak besinsel katkılar olabilmektedir (Quigley vd. 2013).

Polistiren yüzeylerde TSB ve tam yağlı süt içeriklerinde biyofilm üretim kapasitelerine ve fenotipik karakteristiklerine (laktoz fermentasyonu/kazein hidrolizi) seçimi gerçekleştirilen 8 *Geobacillus* ve 15 *Anoxybacillus* üyesi basilin (toplam 23) 316 L tipi paslanmaz çelik kuponlar üzerindeki biyofilm üretim potansiyelleri son seçim kriteri olarak belirlenmiştir. Paslanmaz çelik yüzeyler, gıda endüstrisinde, gıdaların yoğun olarak işlendiği ve en çok temas ettiği yüzeylerdir. Görece ekonomik olması, mikrobiyal korozyondan az etkileniyor ve kolay temizlenebiliyor olması, paslanmaz çeliğin yüzey materyali olarak sıklıkla tercih edilmesine neden olmaktadır (Flint 2001a, Giaouros vd. 2005). Mikrobiyal tutunmada abiyotik yüzeyin fizikokimyasal özellikleri (hidrofobisite, hidrofilisite, yüzey yükü) en önemli çevresel faktörlerin başında gelmektedir. Bu çalışmada tercih edilen 316 L tipi paslanmaz çeliğin hidrofobisitesi/hidrofilisitesi üzerine kesin bir ayrıma varmak pek mümkün değildir. Zira bu tip çeliğin yüzey karakteristiği içinde bulunduğu ortamın doğasından çok fazla etkilenmektedir (Carpentier ve Cerf 1993). Paslanmaz çelik yüzeyin hidrofilisitesine ve hidrofobisitesine yönelik literatürde birbirinden farklılık gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; Brugnoni vd. (2007) ve Teixeira vd. (2005) paslanmaz çelik yüzeyi hidrofobik karakteristikte bir yüzey olarak tanımlamış, Li ve Logan (2004) paslanmaz çeliğin de dahil olduğu tüm metal oksitleri kesin olarak hidrofobik karakteristikte yüzeyler olarak tanımlamıştır. Ancak, Lejeune (2003), Planchon vd. (2007) ve Lerebour vd. (2004) paslanmaz çeliğin içinde bulunduğu ortama bağlı olarak

hidrofilik özellikler gösterdiğini öne sürmektedir. Bazı araştırmacılara göreyse paslanmaz çeliğin hidrofobik ya da hidrofilik karakteristiğinin göreceli olduğu ancak birçok polimere nispeten tartışmasız daha hidrofilik karakteriste olduğu öne sürülmektedir (Boulangé-Petermann 1996). Örneğin; paslanmaz çelik oldukça hidrofilik özellikte olan cama nispeten hidrofobik bir materyal olarak değerlendirilebilecekken, PTFE (politetrafloroetilen) oldukça hidrofobik olan bir yüzeye nispeten hidrofilik özellik göstermektedir. İleri çalışmalarda farklı fizikokimyasal özellikteki abiyotik yüzeylerin termofilik basillerin biyofilm oluşturma kabiliyetlerine yönelik etkileri değerlendirilmiştir. Bu aşamada son seçim kriteri olarak 23 adet bakterinin gıda endüstrisinde en yaygın kullanım alanına sahip paslanmaz çelik materyaller üzerindeki ve standart tam yağlı süt içeriğindeki biyofilm üretim miktarları belirlenmiş ve son noktada 4 *Geobacillus* ve 4 *Anoxybacillus* üyesi seçilmiştir (Çizelge 4.6).

Bu tez çalışması, *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye toplam 104 termofilik basilin gerek kompleks besiyerlerinde gerekse tam yağlı süt içerisinde biyofilm üretimleri açısından karşılaştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Şu ana kadar sadece *A. flavithermus* ve *G. stearothermophilus* olarak bilinen en önemli süt ve süt ürünleri kontaminantlarının yanı sıra, diğer pek çok termofilik basil türünün de bu noktada süt ve süt ürünlerinde biyofilm üretimleriyle ciddi riskler doğurabilecekleri ortaya konmuştur. Bu bağlamda 104 termofilik basilden seçimi yapılan termofilik türler arasında *A. caldiproteolyticus*, *A. kamchatkensis* subsp. *asacharedens*, *A. tepidamans*, *G. thermodenitrificans*, *G. thermoglucidans* ve *G. vulcanii* türlerinin de literatürde tanımlanan diğer termofilik türler kadar potansiyel riskleri olabilecekleri ilk defa bu tez çalışmasıyla ortaya konmuştur.

Tuzluluk (iyonik güç, konsantrasyon), pH ve sıcaklık gibi temel çevresel parametrelerin seçilen 8 bakterinin biyofilm üretim düzeylerine olan etkileri değerlendirildiğinde, tuz konsantrasyonunun, pH'nın ve sıcaklığın izolat ve suş düzeyinde çok farklı etkileşimlere neden olduğu görülmektedir. Çalışma kapsamındaki *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* üyelerinin farklı NaCl konsantrasyonları içeren TSB besiyerleri içerisindeki mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretim kapasitelerinin, artan tuz konsantrasyonlarında (görece geniş tuz toleransı) *Geobacillus* üyelerine nispeten daha

fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.14,4.17; Çizelge 4.12, 4.17) Gerek yüksek düzeyde biyofilm miktarı olsun gerekse yüksek düzeyde mikrobiyal gelişim olsun en yüksek tuz toleransı sergileyen bakteri *A. caldiproteolyticus* A403 olarak saptanmıştır (% 1,0-2,5), (Çizelge 4.8). Bu bakterinin artan tuz konsantrasyonlarında biyofilm üretim eğiliminde yüksek bir artış saptanmıştır. Termofilik basillerin biyofilmlerine yönelik yürütülen çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla tercih edilen *A. flavithermus*'ta (DSM 2641^T), A403 izolatına nispeten biyofilm üretimi itibariyle daha düşük bir tuz toleransı görülmüştür (Şekil 4.11). Çalışmada değerlendirmeye alınan bir diğer *Anoxybacillus* izolatında (F81) yine biyofilm üretimi itibariyle yüksek düzeyde bir tolerans saptanmıştır (Şekil 4.12). Ancak başka bir *Anoxybacillus* üyesinde ise (*A. tepidamans* DSM 16325^T) ancak NaCl ihtiva etmeyen (düşük iyonik güç) besi ortamında kayda değer bir biyofilm üretim yanıtı saptanmıştır (Şekil 4.13). *Geobacillus* üyelerinde *Anoxybacillus* üyelerine nispeten daha düşük iyonik kuvvet içeren ortamlarda (düşük konsantrasyonda NaCl) biyofilm üretim miktarlarında artış görülmüştür. Biyofilm üretim davranışları itibariyle bu grubun üyeleri değerlendirildiğinde en yüksek tuz toleransını *G. thymodenitrificans* DSM 465^T suşu göstermektedir. Her iki cinsin üyelerinin mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretim kapasiteleri arasındaki ilişkinin tuz gereksinimlerine göre kıyaslaması yapıldığında *Anoxybacillus* üyelerinde zayıf bir korelasyon saptanırken, *Geobacillus* üyelerinde kayda değer bir korelasyon saptanmıştır (Çizelge 4.12, 4.17).

pH'nın *Anoxybacillus* üyelerinin biyofilm üretimleri üzerine olan etkisine bakıldığında *A. tepidamans* DSM 16325^T referans suşu haricinde (pH 6,0-7,0) diğer tüm üyelerin alkali pH aralığında anlamlı düzeyde biyofilm üretebildiği görülmektedir. pH'nın biyofilm üretimi üzerindeki etkileri itibariyle en sıra dışı davranışı *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatı sergilemektedir. Bu izolat yüksek alkali koşullarda dahi anlamlı düzeyde biyofilm üretebilmektedir. *Geobacillus* üyeleri hem hafif asidik koşullarda hem de alkali ortamlarda önemli ölçüde biyofilm üretebilirken, en yüksek düzeyde biyofilm üretim miktarları bu cinsin üyelerinde yine alkali pH değerlerinde saptanmıştır. Özetle, hem *Geobacillus* hem de *Anoxybacillus* üyelerinde biyofilm üretim eğilimindeki artış genel olarak alkali pH değerlerinde saptanmıştır. Gerek *Geobacillus* gerekse *Anoxybacillus* üyelerinin farklı pH değerlerindeki mikrobiyal gelişim ve

biyofilm üretim eğilimlerine bakıldığında bir korelasyon görülmemektedir. Bu cinslerin üyelerinin mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri için gereksinim duydukları pH değerleri değişkenlik göstermektedir.

Bakteriyal hücrelerin hücre duvarlarındaki net yük nötral pH’da negatiftir (Rijnaarts vd. 1999). Ancak toplam yükün büyüklüğü türden türe, kültür ortamlarının koşullarına (Gilbert vd. 1991, Kim ve Frank 1994), kültürün yaşına (Walker vd. 2005), kültür ortamının iyonik kuvvetine (Dan 2003) ve pH’sına göre (Husmark ve Rönner 1992) değişkenlik göstermektedir. Hücre yüzeyindeki toplam yük “zeta potansiyeli” ile ifade edilebilmektedir. Zeta potansiyeli, elektriksel bir alan tesiri altında ve tuz konsantrasyon ve pH değerinde bir bakteri hücrelerinin hareketi ile hesaplanmaktadır. Birçok bakteri fizyolojik pH değerinde (pH 7,0) negatif bir zeta potansiyelien sahiptir (Gilbert vd. 1991, Millsap vd. 1997, Lerebour vd. 2004). Ancak bazı durumlarda, *Stenotrophomonas maltophilia* örneğinde olduğu üzere, bakteri fizyolojik pH değerinde pozitif bir zeta potansiyeline sahip olabilmektedir. Bu nedenle fizyolojik pH değerinde pozitif bir zeta potansiyeline sahip olan bir bakteri cam ve teflon gibi negatif yük karakteristiğine sahip yüzeylere yüksek düzeyde tutunma eğilimi göstermektedir (Jucker vd. 1996). Ancak bakterinin bulunduğu ortamın iyonik kuvveti artırıldığında, bakteri negatif bir zeta potansiyeli kazanmakta ve cam-teflon yüzeylere tutunma kabiliyeti değişmektedir. Yüksek iyonik kuvvet bulunduran ortamlarda bazı bakterilerin (*Pseudomonas putida*) zeta potansiyeli düşmekte (sıfıra doğru) ve bakterinin yüzeylere tutunma kapasitesi artmaktadır. Bu durum, ortamın artan iyonik kuvvetinin bakterinin yüzey yükünü baskılaması ve maskeleyesiyle açıklanmaktadır. Benzer bir fenomen artan iyonik kuvvetin bakterinin yüzey yüküyle çeşitli inert yüzeyler arasındaki elektrostatik etkileşimleri engelleyen *L. monocytogenes* örneğinde de görülmektedir (Mafu vd. 1990). Yine benzer bir şekilde, Giaouris vd. (2005) yüksek tuz konsantrasyonu ihtiva eden ortamlarda (% 10,5 NaCl) *Salmonella enterica*’nın paslanmaz çelik yüzeylere tutunma eğiliminin azaldığını göstermiştir. Söz konusu fenomenler, bakteri hücre yüzeyinde bulunan karboksil ve fosfat gibi asidik grupların ve amino gibi bazik grupların dissosiyasyon olarak bakterinin toplam yük potansiyelini içinde bulunduğu ortamın pH ve iyonik kuvvet değerlerine göre değiştirmesiyle açıklanmaktadır (Jucker vd. 1996). Yüksek iyonik kuvvet bulunduran besi ortamlarında,

serbest halde bakteri yüzeyini kaplayacak ve nötralize edebilecek nitelikte çok daha fazla sayıda iyon bulunmaktadır. Elektrostatik etkileşim kromatografisi (ESIC) gibi yaklaşımlar birçok bakterinin yüzey yük karakteristiğini saptamak üzere kullanılmaktadır (Sanderson vd. 1996, Flint vd. 1997, Peng vd. 2001). Bakterilerin rölatif yüzey yükü, hücrelerin anyonik ya da katyonik reçinelere olan bağlanma eğilimleri dikkate alınarak hesaplanabilmektedir. ESIC yaklaşımında, bakteri kültürü anyonik ya da katyonik bir kolondan geçirilmekte ve rölatif retensiyon elüe edilen bakteriyal hücrelere oranlanarak hesaplanmaktadır. ESIC yaklaşımına göre bu zamana dek çalışılan tüm bakterilerin negatif bir yüzey yük karakteristiğine sahip olduğu görülmektedir. Her ne kadar bakteriler genel olarak negatif bir yüzey karakteristiğine sahip olsalar da, *Staphylococcus epidermis* örneğinde; hem anyonik hem de katyonik reçinelerde oldukça yüksek bir bağlanma eğilimi saptanmıştır. Bu durum, bu bakterideki net yük karakteristiğinin negatif olmasına karşın hücre duvarında fazla miktarda katyonik moleküllerin varlığıyla da açıklanmaktadır (Sanderson vd. 1996).

Yüzey yükü, bakterinin içinde bulunduğu ortamın pH'sından da fazlasıyla etkilenmektedir. Husmark ve Rönner (1990) *Bacillus cereus* sporları ile yürüttüğü bir çalışmada ortamın pH'sını (pH 3,0) *Bacillus* sporlarının izoelektrik noktasına eşitlediklerinde, sporların yüzeylere azami düzeyde tutunduklarını saptamışlardır. Ortamın pH'sı izoelektrik noktanın üzerine (pH 4,0) çekildiğinde sporların yüzeylere tutunmasında azalma görülmüştür. Mevcut azalma, spor yüzeyindeki negatif yükün artmasına bağlı olarak yüzeyle spor arasında meydana gelen itişlerle (repulsiyon) açıklanmaktadır. Benzer sonuçlara Flint vd. (1997) yürüttüğü çalışmada da rastlanmıştır. 12 farklı termofilik Streptokok ile yürütülen bu çalışmada, anyonik ve katyonik resinler kullanılarak bakterilerin yüzeylerinin toplam yük karakteristiği belirlenmiştir. Fizyolojik pH'da (pH 7,0) negatif yüklü partikül gibi davranan bu bakterilerin görece negatif yüke sahip paslanmaz çelik yüzeyler üzerine tutunma eğilimlerinin azaldığı saptanmıştır. Gilbert vd. (1991) *E. coli* yüzeyindeki negatif yük miktarının artmasıyla bakterinin yüzeylere tutunma eğiliminin azaldığını rapor etmiştir. Ancak, verilen bu örneklerden farklı olarak *S. aureus* örneğinde yüzeyin negatif yükünün artması yüzeylere tutunma eğiliminde bir azalmaya neden olmamaktadır. Bu bulgudan hareketle bazı bakterilerin yüzeylere tutunmada en önemli belirleyici faktörün

elektrostatik etkileşimler olmadığını ve bazı bakterilerde elektrostatik etkileşimlere ilave diğer kuvvetlerin de tutunma da son derece kritik rolleri olabileceğini öne sürmektedir.

Yukarıdaki bilgilerin ışığında söylenebilir ki, termofilik basillerin sporlarının ve vejetatif hücrelerinin farklı abiyotik yüzeylere tutunma paternlerini belirleyebilmek adına, bakterinin içinde bulunduğu ortamın iyonik kuvvetine ve pH değerine göre nasıl özellikler kazanacağı (zeta potansiyeli) ve bakterinin tutunacağı yüzeyin fizikokimyasal özelliklerinin nasıl değişebileceği net bir şekilde ortaya konmalıdır. Bu tezde çalışılan 8 bakteri de farklı pH değerlerinde ve tuz konsantrasyonlarında polistiren yüzeylerde farklı tutunma eğilimleri sergilemekte ve farklı miktarlarda biyofilm üretmektedir. Bu kapsamda, yürütülen çalışmada değerlendirilen bakterilerin ideal düzeyde biyofilm üretebilmeleri için gereksinim duyacakları iyonik kuvvet (NaCl konsantrasyonu), pH değeri ve sıcaklık değerleri tanımlanmış ve biyofilm üretimleri için gerekli temel fizyolojik ihtiyaçlar açıklığa kavuşturulmuştur. İlerideki olası çalışmalarda mutlak surette termofilik basillerin içerisinde bulunacakları ortamlar simüle edilerek, süt ve süt ürünlerinin işlendiği çevreler olmak üzere, termofilik basillerin çeşitli abiyotik yüzeylere tutunma eğilimlerinin ardındaki fizikokimyasal süreçler net bir şekilde açıklığa kavuşturulmalıdır. Elde edilen bulgular, biyofilm oluşumu için ilk kritik aşama olan yüzeylere tutunma aşamasının engellenmesi adına yeni yaklaşımların geliştirilecek olmasına imkan tanıyacaktır. Çalışmada iyonik kuvvet (farklı NaCl konsantrasyonları)-inkübasyon sıcaklığı (55 °C ve 65 °C), farklı pH değerleri (4,0-11,0) ve farklı inkübasyon sıcaklıkları (45-70 °C) gibi çevresel değişkenlerin, seçilen 8 termofilik basilin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri araştırılmış ve ideal biyofilm üretimi için temel fizyolojik gereksinimler tanımlanmıştır. Yine de değerlendirmeye alınan mevcut çevresel parametlerin olası tüm kombinasyonları birlikte sınanarak, RSM (Response Surface Methodology; Yüzey Yanıt Metodolojisi) gibi matematiksel modeller esas alınarak, biyofilm üretimi için mevcut fizyolojik gereksinimler net bir şekilde tanımlanmalıdır. Zira bu üç faktörün ayrı ayrı değerlendirilmesinden farklı olarak bir arada uygulanması neticesinde bakterinin yüzey yük karakteristiği ve bakterinin tutunacağı yüzey değişkenlik gösterebilir.

Tez çalışmasında farklı *Anoxybacillus* (*A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81) ve *Geobacillus* (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermoglucosidans* B84a) türlerinin aynı cinse ve farklı cinse dahil bakterilerin aynı ortamda çeşitli kombinasyonlarla kültüre alınarak biyofilm yanıtlarının belirlendiği temel çalışmada olası antagonistik/sinerjistik etkileşimlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Farklı *Geobacillus* türlerinin birlikte kültüre alındığı polistiren yüzeylerde, bu bakterilerin tek tek kültüre alındığı yüzeylerdekine nispeten çok daha yoğun bir biyofilm üretimi saptanmıştır (sinerjizm). Ancak süt ve süt ürünlerinin işlendiği çevrelerden sıklıkla izole edilen *A. flavithermus* suşunun diğer *Geobacillus* üyeleri ve *Anoxybacillus* üyesi (F81) ile bir araya geldiğinde ortak bir kültür ortamında daha az miktarda biyofilm üretildiği de dikkate çekici bir durumdur. Bu bulgudan hareketle *A. flavithermus*'un çalışma dahilindeki diğer termofilik basillerle ortak bir biyofilm sistemi içerisinde iyi anlaşamadığı tahminine varılabilir. Ancak söz konusu hipotezin netleştirilmesi adına bu bakterinin diğer termofilik basil üyeleriyle bir araya getirildiği kompleks biyofilm sistemleri içerisindeki komünite davranışları ilave moleküler ve mikroskopik yaklaşımlarla netleştirilmelidir. F81 izolatının (*Anoxybacillus*) DSM 2641^T suşundan farklı olarak özellikle B84a (*Geobacillus*) izolatı ile aynı kültür ortamında bir araya gelmesi durumunda, biyofilm üretiminde çok yoğun bir artışın meydana geldiği de dikkat çekici bir diğer durumdur. Termofilik basillerin süt endüstrisinde bulunabileceği çevrelerde diğer birçok tür ile aynı biyofilm sistemleri içerisinde bulunma ihtimalinin yüksekliği düşünüldüğünde, bu çevrelerden sıklıkla izole edilen termofilik türler ile yapılacak komünite analizleri, bu basillerin neden olabilecekleri sorunların üstesinden gelebilmek adına yeni yaklaşımların geliştirilmesine imkan sağlayabileceği gibi, bu bakterilerin bulunduğu nişlerdeki diğer üyelerle ve çevreleriyle olan karmaşık etkileşimlerin de aydınlatılmasına imkan sağlayacaktır. Literatürde *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin süt ortamındaki bir arada bulunmalarına bağlı olarak gösterebilecekleri gelişim fizyolojilerine yönelik çok kısıtla sayıda veri mevcuttur. Zhao vd. (2013) yürüttüğü çalışmada, *G. thermoglucosidans* TNO-09.020 ve *G. thermoglucosidans* TNO-09.023 izolatları standart tam yağlı süt içerisinde oldukça zayıf bir gelişim gösterdiklerini bulmuştur. Ayrıca farklı türde bakterilerin karışmasına imkan tanımayan ancak; bakterilerin başta kazein olmak üzere hidrolize ettikleri süt bileşenlerinden açığa çıkan metabolitlerin geçişine imkan sağlayan

bir membran içeren sistemde *A. flavithermus* TNO-09.006 suşunun ilavesiyle *Geobacillus* suşlarının gelişiminde çok ciddi artış saptanmıştır. Sütün işlendiği endüstriyel çevrelerde termofilik basillerin biyofilmleri ile neden olabileceği sorunlara yönelik yürütülecek çalışmalarda farklı türlere mensup termofilik basiller arasındaki metabolik ilişkilerin ve mikrobiyotik faktörlerin tanımlanması da en az fiziksel faktörlerin tanınması kadar önem arz etmektedir.

Organik ve inorganik süt komponentlerinin termofilik basillerin biyofilm üretimine olan etkilerinin saptanabilmesi adına, bakteriler Bazal Medium ortamında kültüre alınmışlardır. Zira çalışma kapsamında tercih edilen Bazal Medium, hem çalışılan termofilik basillerin gelişmesi için gereken temel besinsel bileşenleri ihtiva etmekte hem de kompleks bir içeriğe sahip olmadığı için dışarıdan ilave edilen (ekzojen) süt bileşenlerinin biyofilm üretimine olan etkilerini doğrudan gözlemlemek adına kolaylık sağlamaktadır. Bazal Medium içerikleri farklı besinsel içeriklerin biyofilm üretimi üzerindeki etkilerini test etmek adına sıklıkla tercih edilmektedir.

Süt; su, özgül proteinler, kolaylıkla sindirilebilen yağlar, laktoz, çeşitli mineraller ve vitaminler içeren bir gıdadır. Süt genelde nötral pH'ya sahip bir gıdadır (Jensen 1995). Süt proteinleri; kazein, serum albümini ve whey proteinlerinden (laktalbumin ve lactoglobulin) oluşmaktadır (Swaisgood 1995). Kazein miselleri sütteki toplam protein içeriğinin % 80'ine karşılık gelmektedir (Jensen 1995). Standart süt içeriğinin azami % 3,3'ü protein bileşenlerinden oluşmaktadır. Sütün karbohidrat içeriğinin ise çok büyük bir kısmını laktoz oluşturmaktadır. Geriye kalan karbohidrat içeriğini çok az miktarlarda olmak üzere glukoz ve galaktoz oluşturmaktadır (Newburg and Neubauer 1995). Sütün mineral içeriği ise; sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum, sitrat, fosfat ve sülfattan oluşmaktadır (Atkinson vd. 1995).

Sütün kompozisyonunda bulunan laktoz ve non-kazein (kazein olmayan) bileşenlerin, sağım ekipmanlarından izole edilen bazı bakterilerin cam, kauçuk ve paslanmaz çelik gibi yüzeylere olan tutunma eğilimlerini düşük düzeyde de olsa artırdığına yönelik bulgular mevcuttur. Çalışılan bu bakterilerde laktoz ve non-kazein gibi bileşenlerin besi

ortamına ilavesiyle birlikte, hücresel tutunmayı artıran hücre dışı polimerik bileşenlerin biyosentezinin arttığına yönelik bulgular da mevcuttur (Speers ve Gilmour 1985).

Kirtley ve McGuire (1989) protein bileşenlerinin çeşitli abiyotik yüzeyler üzerinde akümüle olarak ve bir film tabakası oluşturarak sütün mikrobiyal florasında bulunabilecek bazı üyelerin, oluşan bu film tabakalarına daha sıkı bir şekilde tutunabildiklerini öne sürmektedir. Speer ve Gilmour'un (1985) farklı süt bileşenlerinin varlığında bakterilerin çeşitli abiyotik yüzeylere olan tutunma eğilimlerinin belirlendiği çalışmada, non-kazein proteinlerin (laktoglobulin ve α -Laktalbumin) varlığında, süt florasında bulunan bazı bakterilerin yüzeylere daha iyi tutundukları saptanmıştır. Ancak, bu çalışmada kazeinin mikrobiyal tutunmada kayda değer bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Bu bulgulara tezat oluşturacak nitelikte, kazein ya da jelatin çözeltilerinde süspansiyon edilen bakterilerin yüzeylere daha fazla tutunduğunu kanıtlayan Meadows'un (1971) çalışması örnek gösterilebilir. Söz konusu durum, başta kazein olmak üzere sütün protein bileşenlerinin biyofilm üretimine olan etkisinin suş ya da tür düzeyinde değişebileceğine yöneliktir. Speers ve Gilmour'a (1985) göre vizkoz özellikteki non-kazein süt proteinleri bakterileri akümüle olmalarını kolaylaştırmakta ve daha stabil biyofilm yapılarının tesisine imkan sağlamaktadır. Barnes (2001) tarafından yürütülen ve süt proteinlerinin bakterilerin paslanmaz çelik yüzeylere olan tutunma eğilimlerini nasıl etkilediğine yönelik yürütülen başka bir çalışmada, yağsız sütün (skim milk) *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Serratia marcescens* gibi bakterilerin bu yüzeylere tutunmalarını azalttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada etkinliği ayrı ayrı değerlendirilen α -kazein, β -Kazein ve κ -Kazein gibi sütün protein bileşenlerinin paslanmaz çelik yüzeylere muamele edilmesi sonucunda *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi bakterilerin muamele edilen yüzeylere daha az tutunduğu görülmüştür. Barnes (2001) gerçekleştirdiği ilave bir çalışmada özellikle κ -Kazein bileşeninin *S. aureus*'un ve *L. monocytogenes*'in tutunmasını ciddi düzeyde azalttığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada β -Kazein ve κ -Kazeinden farklı olarak, α -laktalbuminle muamele edilen yüzeyler üzerinde yüksek düzeyde bakteriyal tutunma saptanmıştır. Barnes (2001) yürüttüğü çalışmada seyreltilen süt içeriğinin sütün içerisinde bulunan süt proteinlerinin yüzeyi daha fazla kaplamasına olanak sağladığı, bunun sonucunda çalışmada tercih edilen bakterilerin bu içerikle muamele edilen yüzeylere daha fazla tutunduğu

görülmüştür. Speers ve Gilmour (1985) ayrıca tam yağlı süt içeriğindeki kazein ve yağ bileşenlerinin bakteriyal tutunmada önemli bir etkisi olmadığını belirtirken, laktoz bileşeninin bakteriyal tutunma üzerinde ciddi bir katkısının olduğunu öne sürmektedir. Fletcher ise (1976) bu fenomene yönelik yürüttüğü öncül çalışmada, bovin serum albümin (BSA), jelatin, fibrinojen ve pepsin gibi proteinlerle muamele edilen yüzeylere bakteriyel tutunmanın azaldığını ancak; kazein ile muamele edilen yüzeylerde az da olsa tutunmanın arttığını öne sürmektedir. Fletcher (1976) aynı zamanda sütün içerdiği bileşenlerin, süt florasında bulunabilecek olan bakterilerin yüzeylere tutunmalarına olan etkilerinin yorumlanmasında genelleme yapılamayacağını, bu durumun ancak bakteriyal türe ve sütün temas ettiği yüzeyin fizikokimyasal özelliklerine göre değerlendirilmesi gerektiğini önermektedir. Ayrıca, sütün içeriğinde bulunan bazı proteinler bakteri yüzeylerindeki makromoleküllerin iyonik kondüsyonlarını modifiye ederek, bakterilerin yüzeylere tutunmalarına mani olabilmektedir (Brooks ve Seaman 1973, Maroudas 1975).

Tezin bu aşamasında, kazeinin çalışılan termofilik basillerin mikrobiyal gelişimlerine ve biyofilm üretimlerine olan etkilerine bakıldığında, artan kazein konsantrasyonlarının tüm bakterilerde gelişimi teşvik ettiği ancak; biyofilm üretiminin sadece *A. caldiproteolyticus* A403 (% 3,0 kazein konsantrasyonu, 65 °C), *A. kamchatkensis* F81 (% 1,5-% 3,0 kazein konsantrasyonları, 65 °C), *G. thermodenitrificans* D195 (% 1,0-% 3,0 kazein konsantrasyonları, 65 °C) izolatlarında düşük düzeyde de olsa teşvik edildiği görülmektedir (Şekil 4.31 - 4.32). Değerlendirmeye alınan 8 termofilik basilin laktozu fermente edebilme ya da kazeinin hidrolize edebilme yeteneklerinin biyofilm üretim sürecinde belirleyici olmadığı görülmektedir. Söz konusu bulguların ışığında sütün majör bir protein bileşeni olan kazeinin termofilik basillerin mikrobiyal gelişimini kısmen teşvik ettiği ancak; çalışılan 8 adet termofilik basilin 3 tanesi dışında kazeinin biyofilm gelişimi üzerinde olumlu ya da olumsuz herhangi bir tesirinin olmadığı görülmektedir. Kazeinin biyofilm üretimine olan olumlu tesiri de oldukça düşük düzeyde saptanmıştır. Bir genelleme yapıldığında kazeinin termofilik basillerin (*Anoxybacillus-Geobacillus*) biyofilm üretim kapasitelerini olumsuz etkilemediği ve olumlu etkilerinin de tür ve suş düzeyinde değişebileceği görülmektedir. Bu sebepten ötürü, kazein bileşeni için termofilik basillerin biyofilm üretimleri ve biyofilmlerinin

neden olabilecekleri riskler üzerine genel bir sonuca varmak mümkün görünmemektedir. Ancak, olası risk yalnızca biyofilm üretimi açısından ele alınmamalıdır. Kazeinin çalışılan tüm termofilik basillerin biyofilm oluşumları dışında, mikrobiyal gelişimini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Dolayısıyla, mikrobiyal gelişimin teşvik edilmesi beraberinde ortam şartlarındaki olası değişimlerle birlikte endospor üretiminin de artacağı ihtimalini akla getirmektedir. Artan artan endospor sayısı, bu spordardan yeni biyo-filmlerin gelişebilme ihtimalini de artırmaktadır. Laktozun etkilerine bakıldığında ise, literatürde laktozun süt florasında bulunabilecek bakterilerin yüzeylere tutunmalarındaki etkilerinin belirlendiği çok az sayıda çalışma mevcuttur (Speers ve Gilmour 1985). Laktozun çalışılan termofilik basillerin biyofilm üretimlerine olumlu hiçbir katkısı saptanmamıştır (Şekil 4.32 - 4.33). Laktozun sadece laktozu fermente edebilen bakterilerin mikrobiyal gelişimi üzerine olumlu bir etkisi görülmüştür. Yine bu durum itibarıyla teşvik edilen mikrobiyal gelişime bağlı olarak, kazein çalışmasında da görüldüğü üzere, zaman içerisinde olası bir şekilde bu bakterilerin yeni biyo-filmler geliştirebilmelerine imkan sağlanması söz konusu olabilmektedir.

Katyonik sodyum, kalsiyum ve magnezyum iyonlarının genel olarak birçok bakteride, yüzeyde bulunan negatif yüklü molekülleri nötrale ederek hidrofobisiteyi artırdığı ve böylelikle bakterilerin yüzeylere tutunmalarını kolaylaştırdığı ön görülmektedir (Bellona ve Drewes 2005). Süt içeriğinde bulunan çeşitli katyonların termofilik basillerin biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerine dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır ve mevcut durum üzerindeki en güncel yaklaşımlar Somerton vd. (2012, 2013) ait çalışmalarında bulunmaktadır. Söz konusu çalışmalarda, sütün içeriğindeki monovalan ve divalan katyon oranlarının termofilik basillerin biyofilm üretimlerini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Aynı çalışmalarda ortamdaki Ca^{2+} ve Mg^{2+} katyonlarının, *Geobacillus* ve *Anoxybacillus flavithermus* suşlarında hücre membran proteinlerinin ifadelerinde artışa neden olduğu ve bu artışın söz konusu suşların yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde oldukları saptanmıştır (Somerton vd. 2013). Ancak, Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} gibi katyonlarının artan konsantrasyonları bir noktadan sonra bu iki suşun mikrobiyal gelişimini inhibe etmektedir. Tez çalışmasında, Bazal besiyeri içeriğine ilave edilen mineral konsantrasyonları, tüm dünyada tüketime sunulan farklı

süt tiplerindeki mineral içeriklerinin azami ve asgari değerleri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Kalsiyum katkısının çalışılan termofilik basillerin gerek mikrobiyal gelişim gerekse biyofilm üretim kapasitelerine olan etkileri göz önünde bulundurulduğunda, *A. caldiproteolyticus* A403 ve *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterilerinde artan kalsiyum konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişimi inhibe ettiği, biyofilm üretiminin ise *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *G. thermodenitrificans* B84a bakterileri dışında tüm bakterilerde kritik bir eşik değerinden (1,75 mg/mL) sonra çok önemli düzeyde arttığı görülmektedir (Şekil 4.34 - 4.35). Söz konusu bulgular, Somerton vd. (2012) çalışmasının bulgularıyla hem örtüşmekte hem de örtüşmemektedir. Zira artan kalsiyum konsantrasyonu tez çalışmasındaki *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun mikrobiyal gelişimini inhibe ederken, literatürdeki çalışma bulgusundan farklı olarak biyofilm üretimi üzerinde kalsiyumun herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. İstinasız 6 bakteride de kalsiyumun belirli bir eşik değerinden sonra (1,75 mg/mL) biyofilm oluşumunu çok fazla miktarda arttırması, kalsiyum içeriği yüksek sütler açısından termofilik basillerin biyofilmleri itibariyle daha fazla risk oluşturma ihtimalini düşündürmektedir.

Somerton vd. (2013) yürüttüğü ve süt kompozisyonundaki minerallerin termofilik basillerin biyofilm oluşturma kabiliyetlerine olan etkilerine yönelik çalışmada, yüksek monovalan katyon oranı (yüksek konsantrasyonda Na⁺ ve K⁺) ve düşük divalant katyon (Mg²⁺) oranlarında *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmlerinin oluşumunda azalma saptanmıştır. Ancak bu bulgulara tezat olacak şekilde çalışmamız dahilindeki termofilik basiller üzerinde potasyumun mikrobiyal gelişim ve biyofilm üretimi üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, *A. flavithermus* DSM 2641^T (artan konsantrasyonlarda mikrobiyal gelişimde inhibisyon) ve *G. thermoglucosidans* B84a (mikrobiyal gelişimde artan konsantrasyonlarda hafif de olsa artış) bakterileri dışında olumlu ya da olumsuz hiçbir etki saptanmamıştır (Şekil 4.36, 4.37). Dikkate değer tek bulgu *A. flavithermus* gibi süt ürünlerinin işlendiği çevrelerden sıklıkla izole edilen bir suşta artan potasyum konsantrasyonlarında görülen mikrobiyal gelişimdeki dramatik düşüştür. Somerton vd. (2012) çalışmasından yine farklı olarak *A. flavithermus* DSM 2641^T suşu dışında artan monovalan (potasyum) konsantrasyonu mikrobiyal gelişimi olumsuz yönde etkilememiştir. Magnezyumun da kalsiyum gibi termofilik basillerin gelişimine ve

biyofilm üretimine olumlu yönde katkıları olduğu bilinmektedir (Somerton vd. 2013). Söz konusu çalışmada artan kalsiyum ve magnezyum konsantrasyonlarının termofilik basil metabolizmasını hızlandırarak mikrobiyal gelişime olumlu yönde katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. Benzer şekilde tez çalışmasında da *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T bakterilerinde artan magnezyum konsantrasyonları mikrobiyal gelişimi önemli ölçüde artırırken diğer bakterilerin mikrobiyal gelişiminde kayda değer bir değişim saptanmamıştır. Magnezyumun biyofilm üretimine yönelik tek müspet katkısı *A. tepidamans* DSM 16325^T suşunda görülmüştür (Şekil 4.38 - 4.39). Sütün kompozisyonundaki bir diğer önemli mineral olan sodyumun termofilik basillerin mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri üzerine olan etkilerine bakıldığında ise farklı süt tipleri içerisinde bulunabilecek sodyum konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişimi olumlu düzeyde etkileyebildiği, ancak biyofilm üretimine kayda değer ölçüde bir katkısı olmadığı görülmektedir (Şekil 4.40 - 4.41).

Somerton vd. (2013) sütü içerisindeki majör minerallerin biyofilm üretimine olan etkilerini değerlendirirken, tez çalışmasındaki yaklaşımdan farklı olarak, monovalan ve divalanan katyon oranlarının etkilerini de araştırmıştır. Bu bağlamda farklı oranlarda monovalan ve divalanan katyon içeriklerine (2:1 ve 10:1) sahip süt formülasyonlarında geliştirdikleri termofilik basillerin paslanmaz çelik yüzeylere standart süt içeriğindeki termofilik basillere nispeten daha fazla tutunma eğiliminde olduklarını saptamışlardır. Ancak buradaki dikkate değer durum çalışılan bakterilerin yüzeylerindeki yük karakteristiklerinin değişimi ve buna bağlı olarak bakterilerin yüzeylerle olan etkileşimlerindeki değişimden kaynaklı olmadığı yönündedir. Çalışmadaki proteomik yaklaşımlarla artan divalanan katyon içeriğinde, termofilik basillerde adhezif karakteristikte yüzey proteinlerinin ifadelerindeki artışa bağlı olarak biyofilm oluşturma yetisindeki artış saptanmıştır. Bu çalışmalarda kesin şekilde artan monovalan katyon miktarının termofilik basillerin biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, divalanan katyonların ise biyofilm oluşumunu teşvik ettiği öne sürülmektedir. Ancak tez çalışmasındaki bulgular bu yaklaşımı desteklediği gibi tezat da oluşturmaktadır. Zira bazı izolat ve referans suşlar gerek mikrobiyal gelişim gerekse biyofilm üretimi açısından değişen mineral konsantrasyonlarında herhangi bir değişim sergilememiştir. Söz konusu durum

sütün içeriğindeki mineraller açısından termofilik biyofilmlerin oluşumlarını ve olası risklerini tanımlanmasını güçleştirmektedir. Tez çalışmasında değerlendirmeye alınan majör süt minerallerinin termofilik basillerin, mikrobiyal gelişimleri ve biyofilm üretimleri üzerlerine olan etkilerinin anlaşılması açısından son derece kritik veriler elde edilse de çalışmanın insan tüketimine uygun şekilde olası tüm mineral oranlarını içeren farklı süt formülasyonlarının göz önünde bulundurularak yeniden değerlendirilmesi ve mümkün mertebe birçok termofilik basilin gelişimlerini ve biyofilm üretimlerini baskılayacak mahiyette en ideal süt formülasyonunun belirlenmesi gerekmektedir.

Söz konusu bulgular, *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmlerinin neden olabileceği riskleri ve bu risklerin doğuracağı ekonomik kayıpları asgari düzeye indirmek adına önem arz etmektedir. Ancak çalışma bulgularının ticari ve endüstriyel uygulamalara uyarlanması açısından geniş ölçekte *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* izolat ve referans suşlarıyla araştırmanın genişletilmesi de gerekmektedir. Uzun sürece yayılan ürün işleme süreçlerinde, mevcut riskin azaltılması için ilave formülasyonların da değerlendirilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, farklı mineral ve organik bileşen içeriğine sahip süt formülasyonlarında *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilm fizyolojisinin ardındaki moleküler mekanizmaların aydınlatılması, henüz yeterince anlaşılammış termofilik basil biyofilmlerin oluşum mekanizmalarının da anlaşılmasına imkan sağlayacaktır.

Modern gıda işleme süreçlerinde paslanmaz çelik, elastomer, polyester, poliüretan, politetrafloroetilen (PTFE) ve kauçuk (paslanmaz çelik boruların bağlantı noktalarında) gibi metalik ve polimerik malzemeler sıklıkla tercih edilmektedir. Bunların içerisinde paslanmaz çelik, kolay üretilmesi, dayanıklı olması, kimyasal ve fiziksel açıdan oldukça stabil olması, korozyona görece dayanıklı olması ve kolay temizlenebilir olması gibi nedenlerden ötürü en sık kullanılan ve tercih edilen malzemedir (Holah ve Gibson 2000). Bazı çalışmalarda, teflon gibi hidrofobik karakteristikteki malzemelerin yüzeylerine cam ve paslanmaz çelik gibi görece daha hidrofilik malzemelerin yüzeylerine nispeten gıdaların işlendiği çevrelerde bulunan bakterilerin daha kolay tutunduğu ve biyofilm üretebildiği öne sürülürken (Pasmore vd. 2002, Teixeira vd. 2005), bazı çalışmalarda da yüzeyin hidrofobitesinin ya da hidrofilitesinin bakteriyal

tutunmada önemli düzeyde belirleyici olmadığına yönelik bulgular öne sürülmektedir (Marouani-Gardi vd. 2009). Ayrıca gıda endüstrisinde tercih edilen metalik ve polimerik malzemelerin net bir şekilde hidrofobik ya da hidrofilik olarak tanımlanması, söz konusu fizikokimyasal nitelikleri, ortamın pH'sı ve sıcaklığı gibi çevresel faktörlerce kolayca değişebileceğinden ötürü tartışmalı bir konu olmaktadır. Bu karmaşaya verilebilecek örnek paslanmaz çelik yüzeydir. Paslanmaz çelik kimi araştırmacılarca hidrofilik bir malzeme olarak değerlendirilirken, kimi araştırmacılarca hidrofobik bir malzeme olarak tanımlanmaktadır (Carpentier ve Cerf 1993). Bu tartışmaya karşın şu kesin olarak söylenebilir ki; paslanmaz çelik polimerlere nispeten hidrofilik karakteristikte bir yüzeydir (Planchon vd. 2007). Örneğin paslanmaz çelik, polimerlere nispeten hidrofilik nitelikteyken, cam gibi pürüzsüz bir malzemeye nispeten hidrofobik bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Bir yüzeyin elektrik yükü bakteriyal tutunma sürecini etkileyen önemli bir faktördür. Örneğin paslanmaz çelik nötral pH'da negatif zeta potansiyeli içermektedir ve zayıf bir negatif elektrik yükü içermektedir. Paslanmaz çelik pH 4,0-4,5'te ise yüksüz bir materyal gibi davranmaktadır (Fukuzaki vd. 1995). Bu durum, bir yüzeyin yük karakteristiğini tanımlarken malzemenin içinde bulunduğu ortamın pH'sından bağımsız düşünülmemeyeceğini göstermektedir. Paslanmaz çelik dışındaki polimerler de (kauçuk, plastik vb.) gıda endüstrisinde ürün bantlarında, konteynırlarda, bağlantı noktalarındaki contalarda ve kesme tahtaları gibi yerlerde sıklıkla kullanılabilir. Bu malzemeler içerisinde sütün işlendiği çevrelerde en çok kullanılan kauçuktur ve kauçuğu kullanım sıklığına göre polipropilen, polikarbonat, polivinil klorür ve teflon gibi malzemeler takip etmektedir. Söz konusu malzemelerin paslanmaz çeliğe nispeten daha poröz yapıda olmaları, mikroorganizmaların bu yüzeylere tutunarak daha fazla miktarda biyofilm üretebilmeleri ihtimalini doğurmaktadır (Faille ve Carpentier 2009). Bakteriyal tutunma ve biyofilm oluşumu bakterilerin bulunduğu ortamdaki inorganik ve organik bileşenlerin substrat ve sıvı faz arasında oluşturdukları kondensasyon filminin yapısına da bağlıdır (Kumar ve Anand 1998, O'Toole vd. 2000, Kokare vd. 2009). Bu fenomen süt ve süt ürünlerinin işlendiği çevreler açısından ele alındığında söz konusu tabakayı (filmi) çoğunlukla sütün içeriğindeki organik bileşenler oluşturmaktadır. Örneğin temiz yüzeyler üzerinde 5 saat gibi kısa bir sürede bu organik tabakalar oluşabilmektedir (Mittelman 1998). Bu tabaka gıdaların işlendiği çevrelerde kullanılan yüzeylerin serbest enerjisi,

hidrofobisitesi ve elektrostatik yükleri gibi fizikokimyasal özelliklerini çok fazla etkilemektedir (Dickson ve Koochmaraie 1989). Süt bileşenleri tarafından meydana gelen kondisyonlanma düzeyi, ortamdaki yüzeyin fizikokimyasal özellikleri tarafından belirlenmektedir. Kondisyonlanma sürecini takiben ilk olarak, ortamda bulunan bakterilerin hücre duvarlarındaki elektriksel yüklü bileşenlerle kondisyonlanan yüzey arasında geri dönüşümlü etkileşimler başlar. Daha sonrasında ise bakterilerde bulunan fimbriya, pilus, flagella ve hücre dışı ortama salgılanan polimerik bileşenler aracılığıyla tutunma geri dönüşümsüz bir düzeye gelir (Kokare vd. 2009). Temas gerçekleşikten sonra bakterinin yüzeye sıkı bir şekilde bağlanmasını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi de ortamın sıcaklığıdır. Örneğin artan sıcaklıklar bakteri yüzeyindeki hidrofobisiteyi artırarak, yüzeylere tutunmayı kolaylaştırmaktadır (Cappello ve Gueglielmino 2006, Di Bonaventura vd. 2008).

Bazı çalışmalarda süt kompozisyonundaki protein bileşenlerin ürünlerin işlendiği yüzeyleri kapatarak sütün florasında bulunabilecek bazı bakterilerin bu yüzeylere tutunmalarını engellediği öne sürülmektedir (Speers ve Gilmour 1985, Helke vd. 1993, Bemborn vd. 2009). Ancak, bazı bakterilerde de (*B. cereus*) mevcut fenomenin aksine sütün içeriğindeki bazı spesifik proteinlerin tutunmayı arttırdığı görülmektedir (Shaheen vd. 2010). Yine süt ürünlerinin işlendiği süreçlerde sıcaklığın 65 °C'nin üzerine çıktığı durumlarda denatüre olan hidrofobik karakteristikteki “whey” proteinleri yüzeyleri daha fazla kaplamaktadır ve bu durum bakterilerin bu tabakalara daha sıkı bir şekilde tutunmalarına olanak sağlamaktadır (Faille vd. 2001, Heyndrickx vd. 2010). Örneğin *G. stearothermophilus* ile yürütülen bir çalışmada hem vejetatif hücrelerin hem de sporların denatüre “whey” proteinleri ile kaplı yüzeylere temiz yüzeylere nispeten 100 kat daha fazla tutunduğu saptanmıştır (Flint vd. 2001b). Ayrıca ürün işleme süreçlerinde sıcaklığın yükselmesine bağlı olarak fakültatif termofilik ve termofilik basillerde spor oluşumu artmakta ve vejetatif hücre formlarına nispeten, ekzosporiyum yapısından ötürü, daha hidrofobik olan sporların bu tabakalara tutunması artmaktadır (Tauveron vd. 2006).

Yukarıda tartışılan veriler dahilinde altı farklı abiyotik yüzeyle ve standart tam yağlı süt içeriğinde gerçekleştirilen tez çalışmasında tercih edilen yüzeylerin (cam, paslanmaz

çelik, polipropilen, polivinil klorür, polistiren ve polikarbonat) fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra yüksek inkübasyon sıcaklığının da artan biyofilm sorununda belirleyici olduğu görülmektedir. Örneğin; 55 °C’de *Anoxybacillus* cinsine dahil üyelerde (*A. flavithermus* DSM 2641^T hariç) tam yağlı süt içeriğinde biyofilm üretimi itibariyle en çok hidrofilik karakteristikteki yüzeylerin (cam ve paslanmaz çelik) tercih edildiği görülmektedir. Bu sonuç, cinse üye bakterilerin, hidrofilik nitelikteki vejetatif hücre yüzeylerinden kaynaklı olarak, hidrofilik yüzeylere daha fazla tutunma eğiliminde olduklarını göstermektedir. Yüksek inkübasyon sıcaklıklarında ise cinse dahil bakteriler tam yağlı süt ortamında daha çok hidrofobik yüzeyleri tercih etmişlerdir. Söz konusu durum, literatür verileriyle de örtüşecek şekilde, yüksek inkübasyon sıcaklığında (65 °C) artan miktardaki denatüre “whey” proteinleriyle ve bu hidrofobik denatüre proteinlerin yüzeyleri kaplaması sonucu artan sporulasyon miktarlarıyla açıklanabilmektedir. Dikkat çeken bir diğer durum, çalışılan hidrofobik yüzeylerin (polikarbonat, polipropilen, polivinil klorür ve polistiren) yüzey enerjilerinin de (44 mN/m, 30,7 mN/m, 41,1 mN/m ve 40,1 mN/m sırasıyla) bakteriyal tutunmada belirleyici olduğudur. 65 °C’deki koşullarda tür ve izolat düzeyinde sonuçlar ele alındığında, biyofilm üretimi açısından tercih edilen hidrofobik yüzeyler açısından bakterilerin hücre yüzeylerinin de ne düzeyde hidrofobik olduğu kestirilebilmektedir. Örneğin; *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharadens* F81 izolatının bu koşullarda en çok polipropilen (30,7 mN/m; görece düşük yüzey enerjisi, yüksek hidrofobisite) yüzeyi tercih etmesi ve *A. tepidamans* DSM 16325^T suşunun bu koşullarda polikarbonat (44 mN/m; görece yüzey enerjisi, görece düşük hidrofobisite) yüzeyi tercih etmesi bu hususta fikir verir mahiyettedir. Her ne kadar 65 °C’de hidrofobik yüzeylerin tür düzeyinde biyofilm üretimi açısından daha çok tercih edildiği görülse de, *Anoxybacillus* cinsinin tüm üyeleri açısından sonuçlar dikkate alındığında yüksek sıcaklıkta yüzeyin hidrofilik ya da hidrofobik karakteristikte olmasının biyofilm üretimi açısından belirleyici olmadığı ve çalışılan her yüzeyin bu anlamda benzer düzeyde risk oluşturabileceği düşünülmektedir. İlgili çalışma *Geobacillus* cinsi üyeleri açısından ele alındığında elde edilen bulgular, *Anoxybacillus* cinsi üyelerinden elde edilen sonuçlarla benzer bulunmuştur. Yine 55 °C’de cam ve paslanmaz gibi hidrofilik yüzeyler biyofilm üretimi itibariyle tercih edilirken (*G. vulcanii* DSM 13174^T hariç), 65 °C’de hidrofobik yüzeyler tercih edilmiştir. Ayrıca bu cinsin üyelerinde de biyofilm üretim kapasiteleri cins düzeyinde ele alındığında 65°C’de

biyofilm üretimi açısından yüzeylerin hidrofobik ya da hidrofilik özellikleri bakımından bir belirleyicilik kalmamaktadır. Bu cinsin üyelerinin 65 °C'deki biyofilm üretimleri yönünden yüzey tercihleri göz önünde bulundurulduğunda (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T; polikarbonat, *G. thermoglucosidans* B84a; polikarbonat, *G. thermodenitrificans* D195; polivinil klorür, *G. vulcanii* DSM 13174^T; cam), *Anoxybacillus* cinsinin üyelerine nispeten daha az hidrofobik hücre yüzey özelliklerine sahip oldukları öne sürülebilmektedir. Mevcut sonuçlar açısından 8 farklı termofilik basilin görece düşük sıcaklıklarda (55 °C) hidrofilik yüzeyler üzerinde daha fazla biyofilm üretebildiği ancak; 65°C'de tür düzeyinde daha çok hidrofobik yüzeyler üzerinde biyofilm üretebildikleri görülmektedir. Bu sonuçlardan hareketle süt ürünlerinin işlendiği ünitelerdeki sıcaklık dağılım heterojenitesi (40-65 °C) göz önünde bulundurularak farklı sıcaklıkların hakim olduğu ünitelerde kullanılacak olan yüzeylerin seçiminde doğru kararlar alınabilmesi mümkün görünmektedir. Mevcut bulgular, bu fenomene yönelik (termofilik basil, farklı abiyotik substratlar, biyofilm oluşumu) literatürdeki en kapsamlı açıklamayı getirmiştir.

Yürütülen bu çalışma kapsamında farklı tipteki sütlerin formülasyonları göz önünde bulundurulduğunda, özellikle içeriklerindeki yağ konsantrasyonlarının termofilik basillerin biyofilm üretimlerini doğrudan etkilediği görülmektedir. Piyasada satışa sunulan ve en çok tüketilen süt tiplerinin ve bu süt tiplerinin yağ içeriklerinin (tam yağlı, yarım yağlı, yağsız) *Geobacillus/Anoxybacillus* biyofilmleri üzerine olan etkilerinin anlaşılması ve farklı yağ konsantrasyonlarında termofilik basil biyofilmlerinin neden olabileceği riskleri kavramak açısından kritik sonuçlar elde edilmiştir. Mevcut literatürde sütün yağ içeriğinin termofilik biyofilmler üzerine olan etkilerine ilişkin kısıtlı bir bilgi birikiminin olduğu görülmektedir. Bu aşamada farklı süt yağ içeriğine sahip süt tipleri, sütün işlendiği çevrelerde termofilik basillerin biyofilm üretebilmeleri için muhtemel en ideal koşullarla (çalışılan her izolat ve referans suş için ideal abiyotik yüzeyler ve inkübasyon sıcaklıkları) birlikte ele alınmış ve biyofilm üretimine olan etkileri kümülatif bir şekilde tespit edilmiştir. Elde edilen bulgularla tüm dünyada en çok tüketime sunulan süt tiplerinin termofilik basillerin biyofilmleri açısından neden olabilecekleri riskler net bir şekilde tanımlanmıştır.

Standart tam yağlı süt (whole milk) tüm dünyada tüketime en çok sunulan ürünlerinde başındadır. Sütteki yağ içeriği, etrafı süt lipit globül membran (MLGM) adı verilen bir yapıyla çevrili vaziyetteki yağ kürecikleri halinde ortama salınmaktadır. Tam yağlı süt içerisinde ortalama % 3,4 (w/v) oranında yağ bulunmaktadır (Jensen 1995). Tam yağlı sütün yanı sıra, yarım yağlı (ortalama % 1,5 yağ) ve yağsız (light) süt (ortalama % 0,1) tipleri de sıklıkla tüketilmektedir. Sütün yağ içeriğinin florada bulunabilecek olan bakterilerin yüzeylere tutunmasına yönelik etkilerine dair yürütülen çalışmalar esasında epey öncelere dayanmaktadır. Örneğin; süt yağı ile muamele edilen paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde çok daha fazla sayıda bakteriyel akümülyasyon olduğu uzun süredir bilinen bir fenomendir ve yağ tabakasına bağlı olarak çok daha fazla sayıda bakterinin yüzeylerde akümüle olması, beraberinde rutin sanitasyon işlemlerinin de yetersiz olması riskini getirmektedir (Maxcy 1973). Süt yağının (çoğunlukla fosfolipitler) dipolar doğasından ötürü, yağın temas ettiği yüzeylerde meydana gelebilecek fizikokimyasal değişimlerdeki olası çeşitlenmeler neticesinde birçok bakterinin tutunmasına olanak sağlanmaktadır. Örneğin; Pasvolsky vd. (2014) süt yağının (özellikle bütirik asitin) *Bacillus* suşlarının süt içerisinde bakteriyel mat yapıları oluşturmalarına olanak sağladığını ve bu biyofilm benzeri yapının da zaten ısıl işlemlere dayanıklı olan *Bacillus* sporlarının elimine edilemelerini imkansızlaştırdığını saptamışlardır. Bu olguda bütirik asitin *Bacillus* suşlarında bir stres sinyali gibi fonksiyon gösterdiği öne sürülmüş ve bu hipotez başka çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bütirik asit *Bacillus*'ta *tapA* geninin ifadesini artırmakta ve bu artış beraberinde biyofilm miktarında artışa neden olmaktadır (Winkelman vd. 2013, Pasvolsky vd. 2014). Teh vd. (2013) özellikle lipolitik aktiviteye sahip termofilik basillerin süt ortamında biyofilm üretimi açısından lipolitik aktivite göstermeyen diğer bakterilere nispeten daha avantajlı olduklarını öne sürmektedir. Zira lipolitik aktive sonucunda süt yağının yıkım ürünlerinden biri de bütirik asittir. Bu bulgularla benzer şekilde, bazı araştırmacılar da sütün yağ içeriğindeki azalmanın, süt florasında bulunabilen bazı bakterilerin de abiyotik yüzeylere tutunmalarını zayıflattığını öne sürmektedir. Örneğin; paslanmaz çelik yüzeylerin yağsız süt, yarım yağlı süt ve süt serumuyla muamele edildiği ve bakteriyel tutunmanın test edildiği bir çalışmada: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* ve *Lactobacillus casei* gibi bakterilerin yüzeylere tutunmasında azalma saptanmıştır (Dat vd. 2014). En az tutunma yarım yağlı süt ve süt serumu ile muamele edilen yüzeylerde saptanmıştır. Aynı

çalışmada farklı yağ içeriğine sahip ürünlerin muamele edildiği yüzeyde, farklı bir topolojide tabaka oluşturduğu ve bu farklanmanın bakteriyel tutunmayı önemli ölçüde belirlediği saptanmıştır. Dat vd. (2014) bu çalışmanın bulgularından hareketle ayrıca, düşük yağ içeriğine sahip ürünlerle süt işleme ünitelerini ön muameleden geçirilmesinin süt florasında bulunan bakterilerin biyofilm oluşturmaları itibariyle neden olabilecekleri riskleri asgari düzeye çekebileceğine yönelik öneride bulunmaktadır. Tez çalışmasında üç farklı yağ içeriğine sahip süt tipi ile (tam yağlı, yarım yağlı ve yağsız) *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine üye bakterilerin en çok tercih ettiği abiyotik yüzeylerde ve iki kritik inkübasyon sıcaklığında (55 °C ve 65 °C) gerçekleştirilen biyofilm örneklemelerinde ve spor sayımlarında, her ne kadar suş ve izolat düzeyinde farklar görülse de çalışılan termofilik basillerin biyofilm üretim eğilimlerinin “tam yağlı” süt” içeriğinde çok daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, sporulasyon miktarı da yine bu süt tipinde daha fazla düzeyde saptanmıştır (55°C’de *Anoxybacillus* üyelerinin “yağsız süt” içeriğinde daha fazla spor üretmeleri haricinde). Söz konusu bulgular mevcut literatür bulgularını destekler mahiyettedir. Bununla birlikte, literatürden farklı olarak ilk kez bu kadar çok sayıda termofilik basil ile farklı içeriğe sahip süt tiplerinin termofilik basillerin biyofilm fizyolojilerini ve sporulasyon kinetiklerini nasıl etkilediğine yönelik bir çalışma yürütülmüştür. Çalışma bu yönü itibariyle de sütteki yüksek yağ içeriğinin termofilik basillerin biyofilm yapıları ile daha fazla risk oluşturmalarına olanak sağlayacağını kanıtlar niteliktedir. Yine mevcut bulgulardan hareketle de bundan sonraki çalışmalara (özellikle sanitasyon denemeleri) “tam yağlı süt” içeriği tercih edilerek devam edilmiştir.

Uzun inkübasyon sürecinin *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilm üretimine olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmada statik koşullar ve seçilen referans suşların en çok tercih ettiği yüzeylerden biri olan paslanmaz çelik yüzey tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda ayrıca mevcut çalışmada öngörülenlerden farklı olarak iki termofilik referans suş için (*A. flavithermus* DSM 2641^T, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T) tanımlanan koşullar için (55-60-65 °C inkübasyon sıcaklıkları; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatlik inkübasyon süreleri, tam yağlı süt içeriği, statik koşullar) biyofilm üretim miktarlarının yüksek tutarlılıkta tahmin edilebileceği bulgular elde edilmiştir. İki referans suş için de çalışılan inkübasyon sıcaklıkları dahilinde en ideal

sıcaklık olarak: 60 °C saptanmıştır. Mevcut çalışmada bir diğer önemli bulgu, uzun inkübasyon sürelerinin (≤ 48 saat) değerlendirilen referans suşların oluşturdukları mevcut biyofilmlerde azalmaya neden olduğudur (Şekil 4.62 - 4.63). Söz konusu durum, belirtilen sürenin üzerinde değerlendirilen termofilik basillerin biyofilmlerinden kopmalar ve dağılmalar meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen bir diğer önemli sonuç, literatürdekinden farklı şekilde laboratuvar koşullarında *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* biyofilmlerinin örneklemelerini yaparken 55°C inkübasyon sıcaklığının değil de, 60 °C'nin tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir. Zira literatürde bu yöndeki çalışmaların neredeyse tamamında termofilik basillerin ideal biyofilm üretimi açısından uygun sıcaklığın 55 °C olduğu önerilmektedir (Flint vd. 1999, 2001a, b).

Termofilik basillerin matriks içeriklerinin tanımlanmasına yönelik yürütülen çalışmalarda değerlendirmeye alınan bakterilerin matriks yapılarındaki yüksek karbohidrat içeriği dikkat çekmektedir. Çalışılan her dört bakteride de matriks kompozisyonundaki baskın polimerin karbohidrat olduğu görülmektedir. Mevcut bakteriler arasında en yüksek karbohidrat içeriği *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında saptanırken, en yüksek protein içeriği *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunda saptanmıştır (Şekil 4.65). Matriks yapılarındaki hücre dışı DNA içerikleri dikkate alındığında ise yine *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatı dikkat çekmektedir (Çizelge 4.40). Mevcut çalışmadaki en önemli bulgu istisnasız her bakteride izole edilen hücre dışı DNA içeriğinin genomik DNA içeriklerinden farklı bir moleküler ağırlığa sahip olmasıdır (Şekil 4.66). Mevcut bulgu net bir şekilde çalışılan termofilik basillerdeki hücre dışı DNA içeriğinin genomik DNA'dan farklı bir kökene sahip olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca tez bulguları dahilinde sunulmasa da, genomik DNA ve hücre dışı DNA polimorfizmlerini kıyaslamak üzere çok sayıda primer ile gerçekleştirilen RAPD-PZR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmalarıyla genomik DNA içeriklerinden sonuç alınsa da hücre dışı DNA içeriklerinden sonuç alınamamıştır. Çalışılan termofilik basillerde hücre dışı DNA'nın termofilik basillerde yapısal ve fonksiyonel rolleri olduğu ilave çalışmalarla kanıtlanırsa da, saflaştırılan içeriğin çok sayıda reaksiyon optimizasyonuna karşın polimeraz enzimine duyarlı olmadığı görülmektedir. Söz konusu durumun, eDNA'nın

katlanma motifi değişkenliği ve konformasyon stabilitesi ile açıklanması muhtemeldir. Matriksteki protein ve karbonhidrat kompozisyonundan ayrılan saf eDNA molekölü muhtemelen daha sıkı şekilde paketlenendiğinden, PCR reaksiyonunda polimeraz enzimi hedef eDNA'ya ulaşamamış ve PCR amplifikasyonu gerçekteşmemiştir. Ancak hücre dışı DNA'nın termofilik basillerin biyofilmlerindeki yapısal ve fonksiyonel rollerine yönelik yürütölen çalışmalarda, hücre dışı DNA'nın DNaz I enzim muamelesine oldukça duyarlı olduğu görölmektedir. DNaz I enzimin gerek biyofilmin oluşum aşamasında gerekse olgunlaşmış biyofilmler üzerinde etkileri olduğu görölmektedir. Biyofilm örnekleme yapılmadan önce DNaz I enzimi ile muamele edilen költürlerde, biyofilm oluşumu önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonucun aynı zamanda çalışılan termofilik basillerin matrikslerindeki hücre dışı DNA miktarlarıyla da doğrudan ilişkili görölmüştür. Zira en yüksek hücre dışı DNA içeriğine sahip olan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatında, DNaz I enzimi ile ön muamele sonucunda kontrol gruplarına oranla biyofilm üretim miktarında çok ciddi bir azalma saptanmıştır (Şekil 4.71). İlgili çalışmada dikkat çeken bir diğer husus, hücre dışı DNA'nın biyofilm oluşumu için kritik olan ilk tutunma aşamasında son derece önemli bir rolü olmasıdır. Zira inkübasyonun erken safhalarında (24-48 saat) enzim muamelesine bağlı olarak biyofilm üretiminde ciddi bir düşüş saptanırken, uzayan inkübasyon sürelerinde mevcut açık kapanmaktadır (Şekil 4.71). DNaz I enziminin olgun termofilik biyofilmler üzerindeki etkilerine bakıldığında ise, enzim muamelesi sonucunda süt ortamında geliştirilmiş kompleks biyofilm örneklelerinde biyokütlenin % 90'lara varan oranda azaldığı görölmektedir (*A. flavithermus* DSM 2641^T hariç), (Şekil 4.72). Bu bulgu hücre dışı DNA'nın termofilik basillerde tartışmasız bir şekilde önemli bir rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan termofilik basillerdeki DNaz I dirençliliği, iki hipotez ile açıklanabilir. Bunlardan ilki, hücre dışı DNA üzerinde oluşan metilasyon desenleriyle ve diğeri ise, hücre dışı DNA'nın yapısal olarak daha stabil ve daha sıkı bir şekilde paketlenmesi sonucu enzimin hedef yapıya ulaşamaması ile ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla, hem PZR reaksiyonlardaki DNA polimeraz enzimi hücre dışı DNA'ya ulaşamamış olabilir (Hewish 1977, Burgoyne vd. 1978, Grande vd. 2010, Jakubovics vd. 2013). Literatürde mevcut fenomene ilişkin en çarpıcı bulgu Kilic vd. (2017) tarafından *Aeribacillus pallidus* E334 izolatı ile yürütölen çalışmada görölmektedir. Bu çalışmada da termofilik bir bakteri olan *Aeribacillus*'ta hücre dışı

DNA içeriğinin DNA polimeraz enzimine duyarlı olmadığı görülmektedir. Tez çalışmasında termofilik *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* hücre dışı DNA içerikleriyle de benzer bir sonuç alınması, söz konusu direncin birçok termofilik basilde yaygın olabileceğini düşündürmektedir.

Tez sürecinde değerlendirmeye alınan sanitasyon stratejileri, çalışmadaki termofilik basillerin biyofilmlerinin biyokimyasal kompozisyonları ve fizyolojileri göz önünde bulundurularak tercih edilmiştir. Uygulanan sanitasyon stratejilerinin etkinliği hem biyomasın (biyofilm hücreleri ve matris) yüzeyden uzaklaştırılması hem de biyofilm hücrelerinin elimine edilmesi dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Enzimatik ve enzimatik olmayan sanitasyon ajanlarının hiçbirinde polistiren yüzeylerden biyokütlenin bütünüyle giderilmesi imkan dahilinde olmamıştır. Her ne kadar bazı sanitasyon stratejilerinde biyofilm hücrelerinin tamamen elimine edilmesi mümkün olsa da biyomas dahilindeki organik ve inorganik bileşenlerin yüzeyde kalması ve giderilememesi daha sonra ortamdaki mikroorganizmaların bu yüzeylere kolaylıkla tutunabilmelerinin önünü açmaktadır. Polistiren yüzeylerde etkinliği saptanan sanitasyon ajanları içerisinde her dört bakteri için de biyomas gideriminde en yüksek etkinlik gösterenler; protein denatüre edici bir ajan olan SDS (% 3) ve protein presipitantı (çöktürücü) olarak fonksiyon gösteren TCA (% 10) olarak belirlenmiştir. Bu bulgulardan hareketle protein fraksiyonunun çalışma dahilindeki termofilik biyofilmlerde öncül bir yapısal fraksiyon olduğunu doğrular niteliktedir. *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinslerine dahil dört bakteri içerisinde de protein tabiatındaki moleküller üzerinde etkinlik gösteren sanitasyon ajanları en fazla *A. flavithermus* DSM 2641^T suşunun ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun biyofilmleri üzerinde etkinlik göstermiştir. Bu termofilik türlerin biyofilmlerindeki toplam protein içeriklerine bakıldığında da söz konusu ilişki açıkça görülmektedir.

Akış koşullarının sütun işlendiği çevrelerde bulunan bakterilerin biyofilm üretim kapasitelerine olan etkilerine yönelik çok az çalışma mevcuttur. Ancak yüksek akış stresinin olduğu ortamlarda düşük akış stresine nispeten bakterilerin yüzeylere çok daha sıkı bir şekilde tutunduğu ve daha kalın biyofilm yapıları oluşturduğu bilinen bir gerçektir (Stoodley vd. 2002, Bremer vd. 2009). Gerek laminar gerekse türbülent akış

streslerinin statik koşullara nispeten bakterilerin yüzeylere daha yakın olmalarına neden olmasından ötürü yüzeylere daha kolay tutunmalarına imkan sağladığı kabul edilmektedir (Donlan ve Costerton 2002).

Gıda endüstrisinde uygulanan yerinde temizlik (CIP; Clean in Place) prosedürleri daha çok gıda kaynaklı hastalıklara neden olan gıda patojenlerinin neden olabileceği sorunları ortadan kaldırmaya yönelikken, söz konusu prosedürler gıda kalitesini olumsuz yönde etkileyen, ancak patojenik olmayan termofilik basillerin ve onların sporlarının elimine edilmesini göz ardı etmektedir (Parkar vd. 2003). Mikroorganizmalar içinde buldukları gıda çevrelerindeki insan yapımı yüzeylerde nemden ve gıda artıklarından ötürü kolaylıkla bu yüzeylere tutunabilmekte ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmanın veya mikroorganizmaların gelişebileceği ideal koşullarda hızla biyofilm üretebilmektedir. Biyofilm üretimiyle birlikte mikrobiyal konsorsiyumun hücre dışı ortama salgıladığı ve biyofilmin yapısal/fonksiyonel bütünlüğünü tesis eden polimerik bileşenler (proteinler, karbohidratlar, yağ asitleri, nükleik asitler, katyonlar, anyonlar vs) biyofilm hücrelerine planktonik karşılıklarına nispeten sanitasyon ajanlarına karşı çok daha dirençli olma kabiliyeti kazandırmaktadır (Joseph vd. 2001). Bu nedenle tez çalışması kapsamında termofilik biyofilm matrikslerindeki toplam protein, karbohidrat ve nükleik asit içeriğinin belirlenmesinin yanı sıra bu fraksiyonları detaylı analizleri ve bu analizler sonucunda spesifik polimerleri doğrudan etkileyecek nitelikteki sanitasyon ajanlarının seçilmesi ve etkinliklerinin ilave pilot çalışmalarla değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Süt endüstrisindeki mevcut sanitasyon uygulamaları daha çok gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlerin ortadan kaldırılmalarına yönelik olduğu için, yalnızca gıda kalitesini bozan ve ekonomik kayıplara neden olan sporlu termofilik basillerin elimine edilmelerine yönelik çok kısıtlı sayıda literatür bulgusu mevcuttur (Parkar vd. 2003, 2004, Bremer vd. 2006, Kilic vd. 2017). Bu bağlamda mevcut sanitasyon stratejilerinin termofilik basillerin ve biyofilmlerinin süt endüstrisinde yaratabileceği muhtemel sorunları ortadan kaldırabilmek adına bu endüstride tercih edilen sanitasyon işlemlerinin biyofilm üreticisi termofilik izolat ve suşlar üzerinde yeniden değerlendirilmesi ve revize edilmesi gerekmektedir. Mevcut stratejilerin yetersiz kaldığı noktada insan sağlığını tehlikeye atmayacak ve işlenen gıdanın kalitesini olumsuz yönde etkilemeyecek yeni stratejilerin belirlenmesi yine önemle ele alınması

gereken bir diğerk durumdur. Ancak süt ve süt ürünlerinin işlendiği çevrelerde mevcut biyofilmlerin ortadan kaldırılmasının hem biyofilmlerin doğal dirençli yapılarından ötürü hem de biyofilm matrikslerinde bulunabilecek mikroorganizmaların ve onları hücre dışı ortama salgılayacakları çok çeşitli biyolojik polimerlerden ötürü son derece güç olduğu kabul gören bir durumdur. Bu nedenle biyofilm üretimi kapasitesi olan termofilik basillerin süt ve süt ürünlerinin üretildiği çevrelerinin taklit edildiği laboratuvar ölçekli çalışmalarla biyofilm üretim davranışlarının belirlenmesi sorunun çözümüne yönelik çok daha etkin yaklaşımların belirlenmesine imkan sağlamaktadır. Tez çalışmasında iki referans suş (*G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *A. flavithermus* DSM 2641^T) ile süt ürünlerinin ana ham maddesi olan standart tam yağlı süt içerisinde ve paslanmaz elik yüzeylerde uzun süreli inkübasyon süreleri dikkate alınarak yrtlen çalışmalarda biyofilm üretim davranışının ivme kazandığı süreçlerin tanımlanması ve buna bağlı risk değerlendirmesi yaparak etkin bir sanitasyon stratejisi/stratejileriyle erken müdahalede bulunmanın çok daha etkin sonuçlar verdiği açığa çıkarılmıştır. Sütün işlendiği çevrelerin mümkün mertebe simüle edildiği çalışmada biyofilm üretiminin hızla yükselişe geçtiği saatlerde (*A. flavithermus* DSM 2641^T için 5. saat, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T için 2. saat) uygulanan sanitasyon işleminin kesin sonuç verdiği mikrobiyolojik sayım yöntemlerinin yanı sıra konfokal lazer mikroskopisi çalışmasında elde edilen verilerle de kanıtlanmıştır.

Enzimatik ajanların biyofilm giderim etkinliklerine bakıldığında, enzimatik olmayan ajanlardan elde edilen sonuçlarla (SDS, TCA) paralel sonuçlar elde edilmiştir. Zira her dört bakteride de alkalen proteaz ve selülaz, etkinlikleri itibariyle ön planda olan enzimatik ajanlardır. Selülaz enzimi beklenildiği üzere karbohidrat içeriği biyofilm matriksinde en yüksek miktarda olan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 izolatının biyofilminde en yüksek etkinliği göstermiştir (% 89,18). Alkalen proteazların termofilik biyofilmlerin gideriminde kullanılacak olması ve bu enzimin kullanımını esas alan farklı sanitasyon stratejilerinin geliştirilecek olması dikkate alınması gereken bir diğerk durumdur. Zira alkalen proteazlar ve amilazlar insan sağlığını tehdit etmeyen, evre dostu ve ekstrem koşullarda (yüksek sıcaklık, alkali ortam) aktivite gösterebilen enzimlerdir. Sütün işlendiği çevrelerdeki yüksek sıcaklıklar göz önünde

bulundurulduğunda termofilik biyofilmlerin giderilmesinde termostabil nitelikteki alkalin proteaz ve amilaz gibi enzimlerin tercih edilmesi kaçınılmaz görülmektedir.

Tamamlanan bu tez çalışmasıyla, *Geobacillus* ve *Anoxybacillus*'un mikrobiyal ekolojisi, biyofilmlerinin termal adaptasyonlarına olan etkileri ve sporulasyon-biyofilm arasındaki ilişki gibi temel konular ilk kez bu denli kapsamlı olarak açıklığa kavuşturulmuştur. Bir biyofilmin giderilmesi için öncelikle yapısının aydınlatılması gerektiği düşüncesinden yola çıkılarak yürütülen bu tezde, endüstriyel ve ticari öneme sahip uygulamalarda yeni giderim stratejilerinin belirlenmesi, özellikle süt endüstrisini yakından ilgilendiren süreçlere çözüm odaklı yaklaşımların geliştirilmesi açısından özgün bir katkı sağlayacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Kovacs, A.T., Kuipers, O.P. and van der Veen, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2); 172-179.
- Ankolekar, C. and Labbé, R.G. 2010. Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3); 982-984.
- Anonymous. 2010. Web Sitesi: <http://www.bacterio.net/anoxybacillus.html>, Erişim Tarihi: 11.09.2017.
- Anonymous. 2010. Web Sitesi: <http://www.bacterio.net/geobacillus.html>, Erişim Tarihi: 11.09.2017.
- Anonnyous. 2017. Web Sitesi: <http://www.milkfacts.info/Nutrition>, Erişim Tarihi: 08.08.2017.
- Anonim. 2011. Web Sites: http://www.tepav.org.tr/upload/mce/gida_sektorunde_deger_zinciri_analizi.pdf, Erişim Tarihi: 08.08.2017.
- Aparna, M.S. and Yadav, S. 2008. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(6); 526-530.
- Aronson, A.I. and Fitzjames, P. 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriological Reviews*, 40(2); 360-402.
- Ash, C., Farrow, J., Wallbanks, S. and Collins, M. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4); 202-206.
- Atrih, A. and Foster, S.J. 2001. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2); 364-372.
- Austin, J.W. and Bergeron, G. 1995. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, 62(3); 509-519.
- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. and Chamberlain, A.H.L. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10); 4543-4548.
- Barnes, R.C. 2001. The rise of corporatist regulation in the English and Canadian dairy industries. *Social Science History*, 25(3); 381-406.

- Basappa, P. 1974. Growth characteristics of thermophilic micro-organisms in milk. *Indian Journal of Dairy Science*, 27; 103-108.
- Beaman, T.C., Greenamyre, J.T., Corner, T.R., Pankratz, H.S. and Gerhardt, P. 1982. Bacterial spore heat-resistance correlated with water-content, wet density, and protoplast sporoplast volume ratio. *Journal of Bacteriology*, 150(2); 870-877.
- Beaman, T.C. and Gerhardt, P. 1986. Heat-resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6); 1242-1246.
- Beech, I.B. 1996. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms-an overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 37(3), 141-149.
- Belduz, A.O., Dulger, S., Demirbag, Z. and Erturk, O. 2000. Isolation and characterisation of *Bacillus flavothermus* strains from a hot spring in North-East Turkey. *Biologia*, 55; 249-258.
- Bellona, C. and Drewes, J.E. 2005. The role of membrane surface charge and solute physico-chemical properties in the rejection of organic acids by NF membranes. *Journal of Membrane Science*, 249(1); 227-234.
- Beloin, C. and Ghigo, J.M. 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1); 16-19.
- Blackman, I.C. and Frank, J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8); 827-831.
- Boulane-Petermann, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10(4); 275-300.
- Bouman, S., Lund, D.B., Driessen, F.M. and Schmidt, D.G. 1982. Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. *Journal of Food Protection*, 45(9); 806-812.
- Boziaris, I. and Adams, M. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology*, 53(2); 105-113.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L. and Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1); 20-26.
- Bremer, P.J., Fillery, S. and McQuillan, A. J. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on

the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3); 254-262.

- Bremer, P.J., Seale, R.B., Flint, S.H. and Palmer, J. 2009. Biofilms in dairy processing. In: Fratamico, P.M., Annous, B.A., Gunter, N.W. (Eds.), *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Limited, 396-431, Oxford.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V. and Briandet, R. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1); 64-70.
- Bridier, A., Meylheuc, T. and Briandet, R. 2013. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*, 48;65-69.
- Brooks, D.E. and Seaman, G.V.F. 1973. The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles: I. Models for the zeta potential increase. *Journal of Colloid and Interface Science*, 43(3); 670-686.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. and Noller, H.F. 1978. Complete nucleotide-sequence of a 16 S ribosomal-RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10); 4801-4805.
- Brugnoni, L. I., Lozano, J.E. and Ubbitt, M. A. 2007. Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40(3); 332-340.
- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3); 1012-1018.
- Burgess, S.A., Lindsay, D. and Flint, S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2); 215-225.
- Burgoyne, L.A., Skinner, J. D. and Marshall, A. 1978. Analysis of the penetrable space within the nucleus. *Journal of Cell Science*, 31(1); 1-11.
- Bylund, G. 1995. *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund.
- Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lawrence, J.R. 1992. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. *Springer*, (1); 1-67.

- Cappello, S. and Guglielmino, S.P. 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3); 205-207.
- Carpentier, B. and Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Microbiology*, 75(6); 499-511.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M. and Ter Steeg, P.F. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90(5); 761-770.
- Chandan, R.C. and Kilara, A. 2010. *Dairy ingredients for food processing*. John Wiley and Sons.
- Chandler, D.P., Brown, J., Bruckner-Lea, C.J., Olson, L., Posakony, G.J., Stults, J.R., Valentine, N.B. and Bond, L.J. 2001. Continuous spore disruption using radially focused, high-frequency ultrasound. *Analytical Chemistry*, 73(15); 3784-3789.
- Characklis, W.G. 1973. Attached microbial growths—I. Attachment and growth. *Water Research*, 7(8); 1113-1127.
- Chen, L., Coolbear, T. and Daniel, R.M. 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14(6); 495-504.
- Chen, S.Q., Tang, Q.Y., Zhang, X.D., Zhao, G.H., Hu, X.S., Liao, X.J., Chen, F., Wu, J.H. and Xiang, H. 2006. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *Food Microbiology*, 23(5); 439-445.
- Chopra, A.K. and Mathur, D.K. 1984. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology*, 57(2); 263-271.
- Cihan, A.C., Ozcan, B. and Cokmus, C. 2009. Characterization of thermostable α -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12); 2205-2217.
- Cihan, A.C., Ozcan, B. and Cokmus, C. 2011. *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an α -glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey *Journal of Basic microbiology*, 51(2); 136-146.
- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N. and Cokmus, C. 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. calidus, subsp. nov., a thermophilic and α -

glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. The Journal of General and Applied Microbiology, 57(2); 83-92.

- Cihan, A.C., Tekin, N., Ozcan, B. and Cokmus, C. 2012. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. Brazilian Journal of Microbiology, 43(1); 309-324.
- Cihan, A.C., Cokmus, C., Koc, M. and Ozcan, B. 2014. *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(1); 211-219.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, 1105-1139, Baltimore.
- Collinson, S.K., Emödy, L., Müller, K.H. and Kay, W.W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. Journal of Bacteriology, 173(15); 4773-4781.
- Cooney, P.H. and Freese, E. 1976. Commitment to sporulation in *Bacillus megaterium* and uptake of specific compounds. Journal of General Microbiology, 95(2); 381-390.
- Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A. and Logan, N.A. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly '*thermoglucosidasius*'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(7); 1470-1485.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B. and Setlow, P. 2004. Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. Journal of Applied Microbiology, 97(4); 838-852.
- Cortezzo, D.E. and Setlow, P. 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. Journal of Applied Microbiology, 98(3); 606-617.
- Cosentino, S., Mulargia, A.F., Pisano, B., Tuveri, P. and Palmas, F. 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus flora* in Sardinian dairy products. International Journal of Food Microbiology, 38(2-3); 235-238.

- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T. I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1); 435-464.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1); 711-745.
- Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3); 217-221.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418); 1318-1322.
- Criado, M.T., Suarez, B. and Ferreiros, C. M. 1994. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. *Food Technology*.
- Crielly, E.M., Logan, N.A. and Anderton, A. 1994. Studies on the *Bacillus flora* of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology* 77(3); 256-263.
- Cucksey, S. 2002. Rapid enumeration of thermophiles. Evaluation of the BacTrac 4100 micro-organism growth analyser in Pahiatua's milk powder factory. Master of Dairy Science and Technology Thesis, Massey University, Palmerston North.
- Czechowski, M.H. 1990. Bacterial attachment to Buna-n gaskets in milk processing equipment. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(2); 113-114.
- Dan, N. 2003. The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27(1); 41-47.
- Dat, N.M., Hamanaka, D., Van Hung, D., Tanaka, F. and Uchino, T. 2014. Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk, buttermilk, and butter serum solutions and its effect on bacterial adherence. *Food Control*, 42, 94-100.
- Davies, D.G. 1999. Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1; 93-118.
- De Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2); 151-158.
- De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J. and De Vos, P. 2004a. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6); 3664-3672.

- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A. and De Vos, P. 2004b. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3); 941-946.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A. and De Vos, P. 2004c. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1); 50–60.
- de Jong, P. 1997. Impact and control of fouling in milk processing. *Trends in Food Science and Microbiology*, 8(12); 401-405.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic sporeformers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3); 318-325.
- Denny, C.B. 1981. Thermophilic organisms involved in food spoilage — introduction. *Journal of Food Protection*, 44(2); 144-145.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'orio, V., Vergara, A., Conter, M. and Ianieri, A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6); 1552-1561.
- Di Martino, P., Fursy, R., Bret, L., Sundararaju, B. and Phillips, R. S. 2003. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7); 443-449.
- Dickson, J.S. and Koohmaraie, M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4); 832–836.
- Dogan, Z., Weidendorfer, K., Muller-Merbach, M., Lembke, F. and Hinrichs, J. 2009. Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. *LWT Food Science and Technology*, 42(1); 81-86.
- Dongari-Bagtzoglou, A. 2008. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6; 201-208.
- Donlan, R.M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8); 1387-1392.
- Donlan, R.M. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2); 167-193.

- Donlan, R.M. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, 17(2); 66-72.
- Driessen, F.M., De Vries, J.O.G.É. and Kingma, F. 1984. Adhesion and growth of thermoresistant streptococci on stainless steel during heat treatment of milk. *Journal of Food Protection*, 47(11); 848-852.
- Driks, A. 2002. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends in Microbiology*, 10(6); 251-254.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dunne, W.M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2); 155-166.
- Ellar, D.J. 1966. Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology*, 92(6); 1748-1759.
- Etoa, F.X. and Michiels, L. 1988. Heat induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 6(3); 43-45.
- Faille, C., Fontaine, F. and Bénézech, T. 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6); 892-900.
- Faille, C., Julien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, F., Slomianny, C. and Benezech, T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(8); 728-738.
- Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, C.L. and Slomianny, C. 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70(10); 2346-2353.
- Finley, N. and Fields, L. 1961. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology*, 10(3); 231-236.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9); 623-633.
- Fletcher, M. 1976. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *Microbiology*, 94(2); 400-404.

- Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant — description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1); 81-97.
- Flint, S.H., Ward, L.J. and Brooks, J.D. 1999. *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2); 759-767.
- Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001a. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2); 151-157.
- Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001b. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2); 151-157.
- Flint, S.H., Ward, L.J.H. and Walker, K.M.R. 2001c. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4); 539-548.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P. H. 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30(8); 1749-1758.
- Fukuzaki S., Urano, H. and Nagata, K. 1995. Adsorption of Pectin onto Stainless Steel Surfaces: Role of Electrostatic Interactions. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 4289; 700-708.
- Ghosh, S., Pengfei, Z., Yong-Qing, L. and Setlow, P. 2009. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*, 191(18); 5584–5591.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.-J. 2005. 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. *Journal of Food Protection*, 68(10); 2149-2154.
- Gilbert, P., Evans, D. J., Evans, E., Duguid, I.G. and Brown, M.R.W. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Microbiology*, 71(1); 72-77.
- Gilmour, A. and Rowe, M.T. 1990. Micro-organisms associated with milk. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology*. Elsevier Applied Science, 37–76. London.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P.R., Beresford, T. P., Fenelon, M.A. and Cotter, P.D. 2015. The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, 6; 1418-1422.

- Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. and Yokota, A. 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp nov and *Brevibacillus limnophilus* sp nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(29); 419-427.
- Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L. J., Di Campli, E., Baffoni, M., Guarnieri, S. and Cellini, L. 2010. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. Journal of Applied Microbiology, 110(2); 490-498.
- Greene, R.A. and Slepecky, R.A. 1972. Minimal requirements for commitment to sporulation in *Bacillus megaterium*. Journal of Bacteriology, 111(2); 557-565.
- Griffiths, M.W. 1995. Foodborne illness caused by *Bacillus* spp. other than *B. cereus* and their importance to the dairy industry. Bulletin of the International Dairy Federation, 302; 3-6.
- Gundogan, N. and Arik, M.T. 2004. Comparison of the protease activity of psychrotrophic and thermophilic *Bacillus* spp. isolated from raw milk samples. The Indian Veterinary Journal, 81(9); 1013-1015.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Archives of Microbiology, 198(1); 1-15.
- Halek, G. and Garg, A. 1988. Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. Journal of Food Safety, 9(3); 215-222.
- Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G. and Heeschen, W. 1996. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting the quality of UHT-milk. Heat Treatments and Alternative Methods: Proceedings of the IDF Symposium, International Dairy Federation, 9-16, Vienna, Austria.
- Hammer, B.K. and Bassler, B.L. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology, 50(1); 101-104.
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E. and Al-Ahmad, A. 2010. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. Journal of Medical Microbiology, 59(Pt 1); 1-7.
- Hayes, P.R. 1985. Quality assurance and production control. In: Hayes, P.R. (Ed.), Food Microbiology and Hygiene. Elsevier Applied Science Publishers, 255, London
- Heinen, W., Lauwers, A.M. and Mulders, J.W.M. 1982. *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile. Antonie van Leeuwenhoek, 48(3); 265-272.
- Helke, D.M., Somers, E.B. and Wong, A. C. 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in

- the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56(6); 479-484.
- Herald, P. J. and Zottola, E.A. 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53(5); 1549-1562.
- Heukelekian, H. and Heller, A. 1940. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4); 547.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K. and Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(10); 2395-2407.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N. and Berkeley, R.C.W. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1); 270-279.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Forsyth, G., Nazli, S., Ali, N. and Berkeley, R.C.W. 1997. A polyphasic reassessment of the genus *Aneurinibacillus*, reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb nov, and emended descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig, *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3); 808-817.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, C. and Logan, N.A. 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1); 99-106.
- Heyndrickx, M. and Scheldeman, P. 2002. Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., De Vos, P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Blackwell Science, 64-82, Oxford.
- Heyndrickx, M., Marchand, S., Jonghe, V.D., Smet, K., Coudijzer, K. and Blocks, J. D. 2010. Understanding and preventing consumer milk microbial spoilage and chemical deterioration. Improving the safety and quality of milk. Volume 2: Improving quality in milk products, 97-135.
- Heyrman, J., Logan, N.A., Busse, H.J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodriguez-Diaz, M., Swings, J. and De Vos, P. 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three

novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2); 501-511.

- Hewish, D. 1977. Features of the structure of replicating and non-replicating chromatin in chicken erythroblasts. *Nucleic Acids Research*, 4(6); 1881-1890.
- Hill, B.M. and Smythe, B.W. 1994. Progress in Understanding the Behaviour of Thermophilic Bacteria During Milk Powder Manufacture. *Milk Powders for the Future II*. The Dunmore Press Limited, 19-26, Palmerston North.
- Hill, B.M. 2004. Thermophilic spores: UHT and retort processing of recombined milks. *Proceedings of the 4th International Symposium on Recombined Milk and Milk Products*. U.S. Dairy Export Council, 184-193, Cancun, Mexico.
- Hill, B.M. and Smythe, B.W. 2012. Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective. *Food Reviews International*, 28(3); 299-312.
- Hintze, P.E. and Nicholson, W.L. 2010. Single-spore elemental analyses indicate that dipicolinic acid-deficient *Bacillus subtilis* spores fail to accumulate calcium. *Archives of Microbiology*, 192(6); 493-497.
- Hodgson, A., Nelson, S., Brown, M. and Gilbert, P. 1995. A simple in vitro model for growth control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(1); 87-93.
- Hoffman, W. 1983. CIP of straight pipes as a function of surface roughness and other factors. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, Keil*.
- Holah, J., Betts, R. and Thorpe, R. 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *International biodeterioration*, 25(1); 147-153.
- Holah, J. and Gibson, H. 2000. Food industry biofilms. In: Allison, D., Gilbert, J. P., Lappin-Scott, H. & Wilson, M. (eds) *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Cambridge University Press, 211-35, Cambridge.
- Holt, C. 1985. The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry. In: Fox, P.F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry - 3*. Elsevier Applied Science, 143-181, London.
- Houdt, R. V., Moons, P., Jansen, A., Vanoirbeek, K. and Michiels, C.W. 2005. Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia*

- plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. FEMS Microbiology Letters, 246(2); 265-272.
- Hup, G. and Stadhouders, J. 1979. Growth of heat-resistant streptococci in cheese milk pasteurizers. III. Specific bacterial flora and its effect on the quality of cheese. Voedingsmiddelentechnologie, 12(24); 29-32.
- Hup, G., Bangma, A., Stadhouders, J. and Bouman, S. 1979. Growth of thermoresistant streptococci in cheese-milk pasteurizers, 1: some observations in cheese factories. Zuivelzicht.
- Husmark, U. and Rønner, U. 1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. Biofouling, 5(4); 335-344.
- Iciek, J., Papiewska, A. and Molska, M. 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during, thermal processing. Journal of Food Engineering, 77(3); 406-410.
- Jakubovics, N.S., Shields, R.C., Rajarajan, N. and Burgess, J.G. 2013. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. Letters in Applied Microbiology, 57(6); 467-475.
- Janssens, J.C., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H. And Vanderleyden, J. 2008. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, 74(21); 6639-6648.
- Jay, J.M. 2003. A review of recent taxonomic changes in seven genera of bacteria commonly found in foods. Journal of Food Protection, 66; 1304-1309.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden and D.A. 2005. Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganisms. In: Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (Eds.), Modern Food Microbiology. Springer, 415-442, New York
- Jensen, R.G. 1995. Water-soluble vitamins in bovine milk. In: Jensen RG, editor. Handbook of milk composition. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.: pp. 688-692.
- Johansen, C., Falholt, P. and Gram, L. 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 63(9); 3724-3728.
- Jones, C.A., Padula, N.L. and Setlow, P. 2005. Effect of mechanical abrasion on the viability, disruption and germination of spores of *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology, 99(6); 1484-1494.

- Jonhstone, K., Ellar, D.J. and Appleton, T.C. 1980. Location of metal ions in *Bacillus megaterium* spores by high-resolution electron probe x-ray microanalysis. FEMS Microbiology Letters, 7(2); 97-101.
- Kalogridou-Vassiliadou, D. 1992. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. Journal of Dairy Science, 75(10); 2681-2686.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology, 64(3); 367-372.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.M., Lazzaroni, J.C., Lejeune, P. and Dorel, C. 2005. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 187(6); 2038-2049.
- Jucker, B.A., Harms, H. and Zehnder, A.J. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. Journal of Bacteriology, 178(18); 5472-5479.
- Kalogridou-Vassiliadou, D. 1992. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. Journal of Dairy Science, 75(10); 2681-2686.
- Karaca, B., Akcelik, N. and Akcelik, M. 2013. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. Biologia, 68(1); 1-10.
- Kaul, A. and Singh, R.S. 1982. Production of stable *Bacillus stearothermophilus* spores. Journal of Food Protection, 45; 795-796.
- Kilic, T., Karaca, B., Ozel, B.P., Ozcan, B., Cokmus, C. and Coleri Cihan, A. 2017. Biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures of thermophilic *Aeribacillus pallidus* E334 biofilms. Biofouling, 33(4); 352-367.
- Kim, J. and Foegeding, P.M. 1990. Effects of heat treatment, CaCl₂ treatment and ethanol treatment on activation of *Bacillus* spores. The Journal of Applied Bacteriology, 69(3); 414-420.
- Kim, K.Y. and Frank, J.F. 1995. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. Journal of Food Protection, 58(1); 24-28.
- Kirtley, S.A. and McGuire, J. 1989. On Differences in Surface Constitution of Dairy Product Contact Materials I. Journal of Dairy Science, 72(7); 1748-1753.
- Knight, G.C., Nicol, R.S. and McMeekin, T.A. 2004. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. International Journal of Food Microbiology, 93(3); 305-318.

- Knight, G.C. and Weeks, M.G. 2008. Conditions for inactivation of thermophilic spores in NaOH solutions for reuse applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 63(3); 82-86.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N. and Mahadik, K.R. 2009. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8; 159-168.
- Kolari, M., Mattila, K., Mikkola, R. and Salkinoja-Salonen, M. 1998. Communitystructure of biofilms on ennobled stainless steel in Baltic Sea water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(6); 261-274.
- Koutzayiotis, C. 1992. Bacterial biofilms in milk pipelines. *South African journal of dairy science= Suid-Afrikaanse tydskrit vir suiwelkunde*.
- Krysinski, E.P., Brown, L.J. and Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 55(4); 246-251.
- Kumar, C.G. and Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1); 9-27.
- Ladd, T.I. and Costerton, J.W. 1990. Methods for studying biofilm bacteria. *Methods in Microbiology*, 22; 285-307.
- Langeveld, L.P.M., Bolle, A.C. and Vegter, J.E. 1972. Cleanability of stainless steel with different degrees of surface roughness. *Nederlands melk-en zuiveltijdschrift*.
- Leclercq-Perlat, M.N. and Lalande, M. 1994. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *Journal of Food Engineering*, 23(4); 501-517.
- Lawrence, J., Korber, D., Hoyle, B., Costerton, J. and Caldwell, D. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173(20); 6558-6567.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G. D., Kuhlicke, U. and Neu, T. R. 2007. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(3); 450-458.
- Lejeune, P. 2003. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends in microbiology*, 11(4); 179-184.
- Lerebour, G., Cupferman, S. and Bellon-Fontaine, M.N. 2004. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1); 7-16.

- Leuschner, R.G.K. and Lillford, P.J. 1999. Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4); 228-232.
- Li, B. and Logan, B.E. 2004. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36(2); 81-90.
- Liao, B.Q., Bagley, D.M., Kraemer, H.E., Leppard, G.G. and Liss, S.N. 2004. A review of biofouling and its control in membrane separation bioreactors. *Water Environment Research*, 76(5); 425-436.
- Lindsay, D., Brozel, V.S., Mostert, J.F. and von Holy, A. 2000. Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. *International Journal of Food Microbiology*, 54(1-2); 49-62.
- Lindsay, D., Brozel, V.S. and von Holy, A. 2005. Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms. *Journal of Food Protection*, 68(4); 860-865.
- Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R. and Scheetz, R. 1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of industrial microbiology*, 8(4); 213-221.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1); 265-275.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K. and Wozniak, D.J. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3); e1000354.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. 2010. *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall, USA.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53(9); 742-746.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2); 133-147.
- Marchant, R., Banat, I.M., Rahman, T.J. and Berzano, M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology*, 4(10); 595-602.
- Marouani-Gadri, N., Chassaing, D. and Carpentier, B. 2009. Comparative evaluation of biofilm formation and tolerance to a chemical shock of pathogenic and

- nonpathogenic *Escherichia coli* O157: H7 strains. Journal of food protection, 72(1); 157-164.
- Marouani-Gadri, N., Firmesse, O., Chassaing, D., Sandris-Nielsen, D., Arneborg, N. and Carpentier, B. 2010. Potential of *Escherichia coli* O157: H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. International Journal of Food Microbiology, 144(1); 96-103.
- Maroudas, N.G. 1975. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. Journal of Theoretical Biology, 49(1); 417-424.
- Masurovsky, E.B. and Jordan, W.K. 1958. Studies on the relative bacterial cleanability of milk contact surfaces. Journal of Dairy Science, 41(10); 1342-1358.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. Journal of Bacteriology, 145(1); 583-595.
- Mattila, K. 2002. Biofilms on stainless steels exposed to process waters. Ph.D. thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A review. Food Reviews International, 8(4); 573-603.
- Maxcy, R.B. 1973. Nature and cause of yellow film occurring on dairy equipment. Journal of Dairy Science, 56(2); 164-167.
- McGuiggan, J.T.M., McCleery, D.R., Hannan, A. And Gilmour, A. 2002. Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. International Journal of Dairy Technology, 55(2); 100-107.
- Meadows, P.S. 1971. The attachment of bacteria to solid surfaces. Archives of Microbiology, 75(4); 374-381.
- Millsap, K.W., Reid, G., Mei, H.C.V.D. and Busscher, H.J. 1997. Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. Canadian Journal of Microbiology, 43(3); 284-291.
- Mittelman, M.W. 1998. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. Journal of Dairy Science, 81(10); 2760-2764.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Current Opinion in Biotechnology, 14(3); 255-261.

- Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K. and Langsrud, S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3); 1005-1012.
- Mostert, J.F., Luck, H. and Husmann, R.A. 1979. Isolation identification and practical properties of *Bacillus* sp. from ultra high temperature and sterilized milk. *South African Journal of Dairy Technology*, 11; 125-132.
- Muir, D.D., Griffiths, M.W., Phillips, J.D., Sweetsur, A.W.M. and West, I.G. 1986. Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some other properties of low-heat and high-heat dried milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 39(4); 115-118.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11); e1000213.
- Murphy, P.M., Lynch, D. and Kelly, P.M. 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2); 45-50.
- Murugan, B. and Villi, R.A. 2009. Lipolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. *The Indian Veterinary Journal*, 86(1); 80-81.
- Müller, K.H., Collinson, S.K., and Kay, W.W. 1991. Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 173(15); 4765-4772.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P. and Poltarau, A.B. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2); 433-446.
- Neu, T.R., Swerhone, G.D. and Lawrence, J.R. 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology*, 147(2); 299-313.
- Neuhaus, F.C. and Addiley, J. 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4); 686-723.
- Newburg, D.S. and Neubauer, S.H. 1995. Carbohydrates in milk. *Handbook of milk composition*, 349, 273.

- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3); 548–572.
- Nold, S.C., Kopczynski, E.D. and Ward, D.M. 1996. Cultivation of aerobic chemoorganotrophic proteobacteria and Gram-positive bacteria from a hot spring microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11); 3917-3921.
- Notermans, S., Dormans, J. A. M.A. and Mead, G.C. 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. *Biofouling*, 5(1-2); 21-36.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F. and Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, 118(1); 133-140.
- Oh, M.H. and Cox, J.M. 2009. Toxigenic bacilli associated with food poisoning. *Food Science and Biotechnology*, 18(3); 594-603.
- Oomes, S.J.C.M., Jonker, M.J., Wittink, F.R.A., Hehenkamp, J.O., Breit, T.M. and Brul, S. 2009. The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *B. subtilis* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3); 234-242.
- Ortega-Morales, B.O., Chan-Bacab, M.J., Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Carrero, J.C. and Stein, T. 2008. Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(1); 9-15.
- O’Toole, G.A. and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3); 449-461.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1); 49-79.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S. and Talon, R. 2007. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiology*, 24(1); 44-51.
- Palmer, J. 2008. Surface characteristics of an adhesive thermophilic spore-forming *Bacillus* isolated from milk powder. PhD Thesis, Massey University, Palmerston North.

- Palop, A., Manas, P. and Condon, S. 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety* 19(1); 57-72.
- Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S. and Brooks, J.D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6); 901-908.
- Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli — potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9); 553-560.
- Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1); 110-116.
- Pasmore, M., Todd, P., Pfiefer, B., Rhodes, M. and Bowman, C.N. 2002. Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. *Biofouling*, 18(1); 65-71.
- Pasvolsky, R., Zakin, V., Ostrova, I. and Shemesh, M. 2014. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *International Journal of Food microbiology*, 181; 19-27.
- Pavic, S., Brett, M., Petric, N., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., Kovacic, A., Cetinic, E. and Ropac, D. 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 56(1); 20-22.
- Pedersen, K. 1990. Biofilm development of stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research*, 24(2); 239-243.
- Peng, J.S., Tsai, W.C. and Chou, C.C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1); 105-111.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E. and Priest, F.G. 1996. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3); 759-764.
- Pikuta, E., Lysenko, A.M., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G.A. and Laurinavichius, K. 2000. *Anoxybacillus pushcinensis* gen. nov., sp nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavothermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6); 2109-2117.

- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N. and Stewart, P.S. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2); 269-276.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S. and Talon, R. 2007. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food microbiology*, 24(1); 44-51.
- Prouty, A.M., Schwesinger, W.H. and Gunn, J.S. 2002. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 70(5); 2640-2649.
- Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y. S. and Kweon, J.H. 2010. 2-(5H)-Furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1); 227-234.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. and Qu, D. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153(7); 2083-2092.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., and Ziebuhr, W. 2000. Alternative Transcription Factor ζ B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. *Journal of bacteriology*, 182(23); 6824-6826.
- Rainey, F.A., Fritze, D. and Stackebrandt, E. 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 115(2-3); 205-211.
- Refstrup, E. 1998. Heat treatment of milk prior to evaporation and drying. *Proceedings of 25th International Dairy Congress*. International Dairy Federation, 228-237, Denmark
- Refstrup, E. 2000. Evaporation and drying technology developments. *International Journal of Dairy Technology*, 53(4); 163-167.
- Ren, P.G. and Zhou, P.J. 2005. *Tenuibacillus multivorans* gen. nov., sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Xin-Jiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1); 95-99.
- Rittmann, B.E., Nerenberg, R., Lee, K. C., Najm, I., Gillogly, T.E., Lehman, G.E. and Adham, S.S. 2004. Hydrogen-based hollow-fiber membrane biofilm reactor (MBfR) for removing oxidized contaminants. *Water Science and Technology: Water Supply*, 4(1); 127-133.

- Rijnaarts, H.H., Norde, W., Lyklema, J. and Zehnder, A.J. 1999. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14(1); 179-195.
- Robinson, R.K. 1990. *Dairy microbiology: Volume 1-The microbiology of milk* (No. Ed. 2). Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Ruckert, A. and Morgan, H.W. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2); 45-61.
- Ronimus, R.S., Rueckert, A. and Morgan, H.W. 2006. Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90(+) year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *The Journal of Dairy Research*, 73; 235-243.
- Ronner, U., Husmark, U. and Henriksson, A. 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *The Journal of Applied Bacteriology*, 69(4); 550-556.
- Rossler, D., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Lin, C.Z., McGill, T.J., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. and Fox, G.E., 1991. Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S ribosomal-RNA sequencing studies. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(3); 266-269.
- Römling, U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology*, 153(4); 205-212.
- Rueckert, A., Ronimus, R.S. and Morgan, H.W. 2005. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, 99(5); 1246-1255.
- Russell, A.D. 1982. The bacterial spore. In: Russell, A.D. (Ed.), *The Destruction of Bacterial Spores*. Academic Press Inc., 1-29, London.
- Rückert, A., Ronimus, R.S. and Morgan, H.W. 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3); 263-272.
- Sanderson, N.M., Guo, B., Jacob, A.E., Handley, P.S., Cunniffe, J.G. and Jones, M.N. 1996. The interaction of cationic liposomes with the skin-associated bacterium *Staphylococcus epidermidis*: effects of ionic strength and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1283(2); 207-214.
- Sang, W. and Sim, S.J. 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat-shocked during sporulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(4); 633-636.

- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S. and Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3); 542-555.
- Schembri, M.A., Kjærsgaard, K. and Klemm, P. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 48(1); 253-267.
- Schlafer, S. and Meyer, R.L. 2016. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*, doi: 10.1016/j.mimet.2016.03.002.
- Schwarzenbach, R.R. and Hill, B.M. 1999. Do bacterial spores in milk powders survive UHT processing. *Milk Powders for the Future 4*, Palmerston North, 30 June–2 July 1999. Dairy Institute, 53-58, New Zealand.
- Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R. and Flint, S.H., 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2); 109-117.
- Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J. and Bremer, P.J. 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3); 731-737.
- Seale, R.B. 2009. The surface characteristics of spores from thermophilic bacilli isolated from a milk powder production line and their influence on adhesion to surfaces. PhD Thesis, The University of Otago, Dunedin.
- Setlow, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6); 550-556.
- Setlow, P. 2005. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3); 514-525.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Doziol-Dube, K. and Setlow, P. 2006. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β -type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*, 188(11); 3740-3747.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A. and Salkinoja-Salonen, M. 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27(3); 347-355.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. and Komagata, K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4); 939-946.
- Shirtliff, M.E., Mader, J.T. And Camper, A.K. 2005. Molecular interactions in biofilms. *Chemistry and Biology*, 9(8); 859-871.

- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: Sneath, P.H. A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, 1104-1105, Baltimore.
- Somerton, B., Palmer, J., Brooks, J., Smolinski, E., Lindsay, D. and Flint, S. 2012. Influence of cations on growth of thermophilic *Geobacillus* spp. and *Anoxybacillus flavithermus* in planktonic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7); 2477-2481.
- Somerton, B., Flint, S., Palmer, J., Brooks, J. and Lindsay, D. 2013. Preconditioning with cations increases the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* and *Geobacillus* species to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13); 4186-4190.
- Somerton, B., Lindsay, D., Palmer, J., Brooks, J., and Flint, S. 2015. Changes in sodium, calcium, and magnesium ion concentrations that inhibit *Geobacillus* biofilms have no effect on *Anoxybacillus flavithermus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15); 5115-5122.
- Speers, J.G.S. and Gilmour, A. 1985. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 59(4); 325-332.
- Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y. and Churey, J.J. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18; 585-587.
- Sreekumari, K.R., Sato, Y. and Kikuchi, Y. 2005. Antibacterial Metals—A Viable Solution for Bacterial Attachment and Microbiologically Influenced Corrosion—. *Materials Transactions*, 46(7); 1636-1645.
- Stadhouders, J., Hup, G. and Hassing, F. 1982. The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. *Netherlands Milk and Dairy Journal*.
- Starkey, M., Parsek, M.R., Gray, K. A. and Chang, S.I. 2004. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. In *Microbial biofilms*, 174-191, American Society of Microbiology.
- Steinberger, R.E. and Holden, P.A. 2005. Extracellular DNA in single-and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9); 5404-5410.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. and Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2); 175-179.

- Stewart, P.S., McFeters, G.A. and Huang, C.T. 2000. Biofilm control by antimicrobial agents, Chapter 11 in *Biofilms II: Process Analysis and Applications*.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. 1998. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology*, 85(S1).
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. 1999. The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environmental Microbiology*, 1(5); 447-455.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56; 187-209.
- Suárez, B., Ferreirós, C.M. and Criado, M.T. 1992. Adherence of psychrotrophic bacteria to dairy equipment surfaces. *Journal of Dairy Research*, 59(3); 381-388.
- Suihko, M.L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M. and Raaska, L. 2004. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6); 1228-1235.
- Suzuki, Y., Kishigami, T. and Abe, S. 1976a. Production of extracellular α -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(6); 807-812.
- Suzuki, Y., Yuki, T., Kishigami, T. and Abe, S. 1976b. Purification and properties of extracellular α -glucosidase of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445(2); 386-397.
- Swaisgood, H.E. 1995. Protein and amino acid composition of bovine milk. *Handbook of milk composition*. 1; 464-468.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. and Yaron, S. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2); 200-206.
- Tai, S.K., Lin, H.P.P., Kuo, J. and Liu, J.K. 2004. Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. *Extremophiles*, 8(5); 345-349.
- Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shinamura, S. and Takaki, Y. 2004. Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana trench. *Extremophiles*, 8(5); 351-356.
- Tang, X., Flint, S.H., Bennett, R.J., Brooks, J.D. and Morton, R.H. 2009. Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy

- industry on ultrafiltration membranes. *Journal of industrial microbiology and Biotechnology*, 36(12); 1491.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. and Faille, C. 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3); 254-262.
- Tang, X., Flint, S.H., Bennett, R.J. and Brooks, J.D. 2010. The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. *Journal of Membrane Science*, 352(1); 71-75.
- Teh, K.H., Lindsay, D., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P. and Flint, S. 2013. Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2); 129-135.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. and Vieira, M.J. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22(2); 247-251.
- Tipper, D.J. and Gauthier, J.J. 1972. Structure of the bacterial endospore. In: Halvorson, H.O., Hanson, R., Cambell, L.L. (Eds.), *Spores V*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 3-12.
- Tischler, A.D. and Camilli, A. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 53(3); 857-869.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P. C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S. and Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of Bacteriology*, 182(22); 6482-6489.
- Ueda, S. and Kuwabara, Y. 2007. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. *Biocontrol Science*, 12(4); 149-153.
- Van der Mei, H.C., De Vries, J. and Busscher, H.J. 1993. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12); 4305-4312.
- Vanhaecke, E.R.W.I.N., Remon, J.P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D. and Van Peteghem, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3); 788-795.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., and Schué, F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2); 377-410.

- Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E. and Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5; 20.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1); 1-43.
- Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J. and Brözel, V.S. 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9); 2861-2868.
- Vinter, V. 1969. Physiology and biochemistry of sporulation. In: Gould, G.W., Hurst, A. (Eds.), *The Bacterial Spore*. Academic Press, 73-124, London.
- Vries, Y.P.D. 2006. *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Yuan, D.D., Liu, G. C., Ren, D.Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.P. and Zhang, L.B. 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*, 25(2); 752-757.
- Waino, M., Tindall, B.J., Schumann, P. and Ingvorsen, K. 1999. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2); 821-831.
- Walker, S.L., Hill, J.E., Redman, J. A. and Elimelech, M. 2005. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6); 3093-3099.
- Warnecke, F. 2001. The Ecology of Thermophilic Bacilli of Milk Powder Processing Plants. Thesis, University of Waikato, Hamilton, M.Phil.
- Warriner, K. and Waites, W.M. 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose: ribose. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2); 97-102.
- Watanabe, M., Sasaki, K., Nakashimada, Y. and Nishio, N. 1998. High density cell culture of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. with self-flocculated cells. *Biotechnology Letters*, 20(12); 1113-1117.
- Watkinson, W.J. 2008. Chemistry of detergents and disinfectants. In: Tamime, A. (Ed.), *Cleaning-in-Place*. Blackwell Publishing, 56-80, Oxford.

- Webb, J.S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B. and Kjelleberg, S. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 185(15); 4585-4592.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559); 1487-1487.
- Wienczek, K.M., Klapes, N.A. and Foegeding, P.M. 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9); 2600-2605.
- Wimpenny, J.W. and Colasanti, R. 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(1); 1-16.
- Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming, H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances?. In *Microbial extracellular polymeric substances* (pp. 1-19). Springer Berlin Heidelberg.
- Winkelman, J.T., Bree, A.C., Bate, A.R., Eichenberger, P., Gourse, R. L. and Kearns, D. B. 2013. RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 88(5); 984-997.
- Wirtanen, G., Ahola, H. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Evaluation of cleaning procedures for elimination of biofilm from stainless steel surfaces in open process equipment. *EUR*; 167-177.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G. and Poralla, K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S ribosomal-RNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2); 263-269.
- Wolfe, A.J., Chang, D.E., Walker, J. D., Seitz-Partridge, J.E., Vidaurri, M. D., Lange, C. F. and Conway, T. 2003. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Molecular Microbiology*, 48(4); 977-988.
- Woodward, M.J., Sojka, M., Sprigings, K. A. and Humphrey, T.J. 2000. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *Journal of Medical Microbiology*, 49(5); 481-487.
- Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(5); 1318-1328.

- Yoon, J.H., Kang, K.H. and Park, Y.H. 2002. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6); 2043-2048.
- Yoon, J.H., Oh, T.K. and Park, Y.H. 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariáz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6); 2163-2167.
- Zarilla, K.A. and Perry, J.J. 1987. *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov. a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(3); 258-264.
- Zhao, Y., Caspers, M.P., Metselaar, K. I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R. and Kort, R. 2013. Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18); 5652-5660.
- Zobell, C.E. and Allen, E.C. 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, 29(3); 239.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6); 1452-1463.
- Zottola, E.A. 1991. Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces. *Biofouling*, 5(1-2); 37-55.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Başar KARACA
Doğum Yeri : İskenderun
Doğum Tarihi : 11.07.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Atatürk Lisesi (2003)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004-2008)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2008-2011)
Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2011- 2018)

SCI Yayınlar

T. KILIC, **B. KARACA**, B.P. OZEL, B. OZCAN, C. COKMUS and A. C. CIHAN, Biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures of thermophilic *Aeribacillus pallidus* E334 biofilms, BIOFOULING, 2017, 33(4); 352-367.

A.C. CIHAN, **B. KARACA**, B.P. OZEL and T. KILIC, Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to *Bacillaceae* family, WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, 2017, 33(6); 118.

N. TEKIN, A. COLERI CIHAN, **B. KARACA** and C. COKMUS, A Comparative Study: Taxonomic Grouping Of Alkaline Protease Producing Bacilli, Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(1); 39-56.

B. KARACA, N. AKCELIK and M. AKCELIK, Effects Of P22 Bacteriophage P22 on *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium DMC4 Strain Biofilm Formation and Eradication, Archives of Biological Sciences, 2015, 00(4); 114-114.

B. KARACA, N. AKCELIK and M. AKCELIK, Biofilm-producing Abilities of *Salmonella* Strains Isolated From Turkey, Biologia, 2013, 68(1); 1-10.

B. KARACA, S. BUZRUL, V. TATO, N. AKCELIK and M. AKCELIK, Modeling and Predicting The Biofilm Formation of Different *Salmonella* Strains, Journal of Food Safety, 2013, (33)4; 503-508.

Hakemli Dergiler

P.B. OZEL, T. KILIC, **B. KARACA**, E. DEREBAI YILDIZ, C. COKMUS and A. COLERI CIHAN, Productive Biofilms From Mesophilic To Thermophilic Endospore-forming Bacilli For Industrial Applications, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2017, 7(1); 14-21.

B. KARACA, I. AKATA and A. COLERI CIHAN, *Lentinus Edodes*, *Lactarius Delicious* ve *Ganoderma Lucidum*'un Antibiyofilm ve Antimikrobiyal Etkinlikleri, Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 2017, 17(4); 660-668.

Uluslararası Kongreler

B. KARACA, N. SHOMALI, A.B. KARAKAYA, A. COLERI CIHAN and O. YILDIRIM, Evaluation Of *Pleurotus ostreatus* Extracts For Its Potential Antibiofilm Activity, Poster Sunumu, 1st International Congress On Medicinal and Aromatic Plants "Natural and Healthy Life", 10 Mayıs, 2017, 12 Mayıs 2017.

A. COLERI CIHAN, **B. KARACA**, A.B. KARAKAYA, I. AKATA and E.M. ALTUNER, Antibiofilm Effects Of Three Macrofungi (*Morchella angusticeps*, *Trametes versicolor*, *Lactarius delicious*) On *Enterococcus faecalis*, Poster Sunumu, I. International Congress On Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life", 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017.

A. COLERI CIHAN, **B. KARACA**, E.M. ALTUNER, I. AKATA and O. YILDIRIM, Synergism Between *Lactarius delicious* and Vancomycin Against Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, Poster Sunumu, I. International Congress On Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life", 10 Mayıs 2017, 12 Mayıs 2017.

P.B. OZEL, T. KILIC, **B. KARACA** and A. COLERI CIHAN, *Brevibacillus thermoruber* B93: A Remarkable Biofilm Producing Strain For Further Industrial Applications., Poster Sunumu, Biofilms 7, 26 Haziran 2016, 3(17); 178 - 179.

T. KILIC, P.B. OZEL, **B. KARACA** and A. COLERI CIHAN, Determinations Of Biofilm Characteristics And Evaluation Of Sanitation Procedures On Biofilms Of Thermophilic *Aeribacillus pallidus*, Poster Sunumu, Biofilms 7, 26 Haziran 2016, 3(7); 236 - 237.

B. KARACA, C. OZDEMIR, F.N. YUKSEL, N. TASKALE KARATUG and M. AKCELİK, More Powerful *Salmonella* Biofilms: A New Scenario Directed By Subinhibitory Antibiotic Concentrations?, Poster Sunumu, 25th Eccmid Congress, Copenhagen, Danimarka, 25 Nisan 2015.

C. OZDEMIR, **B. KARACA** and N. AKCELIK, The Role Of Extracellular DNA in *Salmonella* Biofilms: Is It Intimate Relationship With Matrix Or Initial Adhesion?, Poster Sunumu, 25th Eccmid Congress, Copenhagen, Danimarka, 25 Nisan 2015.

B. KARACA, M. AKCELIK, N. TASKALE KARATUG and F. N. YUKSEL, The Efficacy Of P22 Bacteriophage As a Method Of *Salmonella* Typhimurium Biofilm Eradication, Poster Sunumu, 23rd Eccmid Congress, Berlin, Germany., 27 Nisan 2013.

B. KARACA, M. N. ARIAFAR, M. DIANI, N. TASKALE KARATUG and B. YAVAS, Biofilm Producing Abilities of *Salmonella* Strains Isolated From Turkey, Poster Sunumu, 22nd Eccmid Congress, London, UK., 31 Mart 2012.

Ulusal Kongreler

B. KARACA, I. AKATA and M. AKCELIK, *Lentinula edodes* (berk.) Pegler. (shiitake): Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Kullanım Potansiyellerinin Araştırılması, Poster Sunumu, II. Ulusal Mikoloji Günleri, 01 Eylül 2015.

B. KARACA, I. AKATA and M. AKCELIK, *Ganoderma lucidum*'un Antmikrobiyal ve Antibiyofilm Etkilerinin Değerlendirilmesi, Sözlü Sunum, 1. Ulusal Mikoloji Günleri, 01 Eylül 2014.

Diğerleri

Görev Aldığı Projeler

TÜBİTAK 1001, BURSİYER, Süt Endüstrisinde Termofilik Basillerin Biyofilm Oluşumlarının ve Biyofilm-Spor Giderimlerinin Mikrobiyolojik, Mikroskopik ve Moleküler Biyolojik Tekniklerle İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) (Devam ediyor).

KURUMSAL BAP, ARAŞTIRMACI, Termofilik *Anoxybacillus* Türlerinin Alfa-amilaz genlerinde Yapısal ve İşlevsel Genomik Çalışmalar, Yürütülen Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi), 01 Kasım 2016, 01 Kasım 2017.

KURUMSAL BAP, ARAŞTIRMACI, Tıbbi Ve Yenilebilir Bazı Makrofungus Türlerinin Çoklu İlaç Dirençli *Enterococcus* Suşlarında Antimikrobiyal Ve Antibiyofilm Etkilerinin Değerlendirilmesi, Yürütülen Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Ocak 2016, 01 Mart 2017.