

Gıda İşletmelerinde Biyofilm Sorunu ve Gümüş Nanopartikül Uygulamaları

Nuray GÜRLÜK

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü
nuray4208@gmail.com
ORCID: 0000-0003-1268-6196

Ahmet KOLUMAN

Pamukkale Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
akoluman@pau.edu.tr
ORCID: 0000-0001-5308-8884

Tolga KAHRAMAN

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü
tolgakah@istanbul.edu.tr
ORCID: 0000-0003-4877-6951

Geliş tarihi / Received: 23.03.2021

Kabul tarihi / Accepted: 09.05.2021

Öz

Mikroorganizma topluluklarının besine ulaşım ve savunma amaçlı ortak yaşam tarzını ifade eden biyofilmlerin dezenfektan ve antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç, bu mikrobiyal topluluklar ile savaşmak için farklı yöntemlerin uygulanması konusunda araştırmalar yapılmasını gerektirmiştir. Ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerden oluşan matrise gömülü olarak yaşayan biyofilm toplulukları buldukları yüzeye güçlü bir şekilde yapıştığından ortamdan uzaklaştırılmaları güçleşmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak yüzeylerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Boyutları 100 nm'den küçük olan gümüş nanopartiküller geniş yüzey alanı-hacim oranlarından kaynaklanan benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleriyle Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptirler ve direnç tetiklememektedirler. Bu çalışmada gıda işletmelerinde oluşan biyofilmlere karşı kullanılacak gümüş nanopartikül uygulamaları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Biyofilm, dezenfektan, gıda güvenliği, gümüş nanopartikül, hijyen*

Biofilm Problem and Silver Nanoparticle Applications in Food Processing Facilities

Abstract

The resistance developed by biofilms against disinfectants and antibiotics, which express the life-style of microorganism communities for access to food and defense, has required research on the

application of different methods to combat these microbial communities. Biofilm communities that live embedded in the matrix consisting of the extracellular polymeric substances they produce are strongly adhered to the surface where they are located, making it difficult to remove them from the environment. Microorganisms that cause foodborne diseases can survive on surfaces by forming biofilms. Silver nanoparticles, which are smaller than 100 nm, have broad spectrum antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria with their unique chemical and physical properties due to their large surface area volume ratio and do not cause resistance. In this study, silver nanoparticle applications which can be used against biofilms in food processing facilities were investigated.

Keywords: *Biofilm, disinfectant, food safety, silver nanoparticles, hygiene*

Giriş

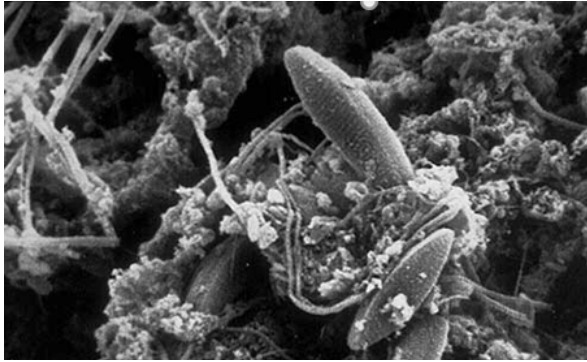
Bakteriler, insan hastalıklarının ve ölümlerinin başlıca kaynağı olan, en çok görülen mikroorganizma grubu olarak ifade edilmektedir (Wilson, 2012). Mikroorganizmaların ve patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmler, özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri direnç sebebiyle halk sağlığı açısından büyük öneme sahiptir (Donlan, 2002). Restoranlarda servis edilen yemeklerden kaynaklanan gıda kaynaklı salgınların oranı tam olarak bilinmese de tüketilen bu yemekler, gıda kaynaklı salgın hastalık kaynağı olarak önem arz etmektedir (Jones ve Angulo, 2006). Gelişmiş ülkelerde gıda kaynaklı hastalıkların %70 'inin, toplu tüketim yapılan restoran ve benzeri işletmelerde hazırlanan gıdalarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Alsayeqh, 2015). Patojen bakterilerin pek çoğu uygun ortam koşulları oluştuğunda gıdalar ve gıdalara temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturmaktadır. Gıda işletmelerinde biyofilmlerin varlığı gıda güvenliği açısından risk teşkil etmektedir (Shi ve Zhu, 2009). Restoran mutfaqları ve benzeri gıda işleme ortamları, mikroorganizmaların su ve besine ulaşımı veya hammaddeler ile mikroorganizmaların taşınması gibi biyofilm oluşumunu destekleyen çeşitli koşulları sağlayabilmektedir (Bower, McGuire ve Daeschel, 1996).

Son dönemde benzersiz fizikokimyasal özellikleri gümüş nanopartiküllerin (NP'lerin) antimikrobiyal ajan olarak en çok kullanılan nanomateryallerden biri haline gelmesine sebep olmaktadır. Gümüş NP'ler, antimikrobiyal ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır (Abbaszadegan vd., 2015). Gümüş NP'ler, pek çok Gram negatif ve Gram pozitif bakteriyi yok etmek için etkili bir ajandır. Ayrıca antibiyotiklere dirençli suşlara karşı da bakterisit etki göstermektedir (Pulit-Prociak ve Banach, 2016).

Biyofilm Yapısı ve Özellikleri

Biyofilmler, gıda üretim ortamının tipine ve kolonileşen türlere bağlı olarak farklı kompozisyonlara sahip bir hücre dışı matrisine gömülü, bakteri ve mantar gibi bir veya daha fazla tür mikroorganizmanın oluşturduğu karmaşık mikrobiyal ekosistemlerdir (Galié, Garcia-Gutierrez, Miguelez, Villar ve Lombo, 2018). Bir yüzeye, cisme, ara yüzeye ya da birbirine yapışık halde bulunan bu mikroorganizma topluluklarından oluşan ve ekzopolimerik matris (EPS) içinde gömülü bulunan biyofilmler, maddelerin difüzyonunu kısıtlayabilmeleri ve büyük protein moleküllerini bağlayabilmeleri sebebi ile antimikrobiyalere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır (Donlan ve Costerton 2002; Ishida, Ishida, Kurosaka, Otani ve Kobayashi, 1998). Yumuşak çelik üzerinde gelişen doğal bir biyofilmin

tarama elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir. Bir biyofilmde birden fazla bakteri türünün bulunması biyofilmin bir yüzeye yapışmasını kolaylaştırabilmesinin yanı sıra bu ‘karışık biyofilm’, kuaterner amonyum bileşikler gibi dezenfektanlara ve diğer biyositlere karşı daha yüksek direnç göstermektedir (Galié vd., 2018). Ayrıca bu farklı türler arası iletişim biyofilmin gelişimini, yapısını ve işlevini şekillendirmektedir (Yang vd., 2011).



Şekil 1. Endüstriyel bir su sisteminde sekiz haftalık bir periyotta yumuşak çelik yüzeyde gelişen doğal bir biyofilmin görüntüsü (Donlan, 2002)

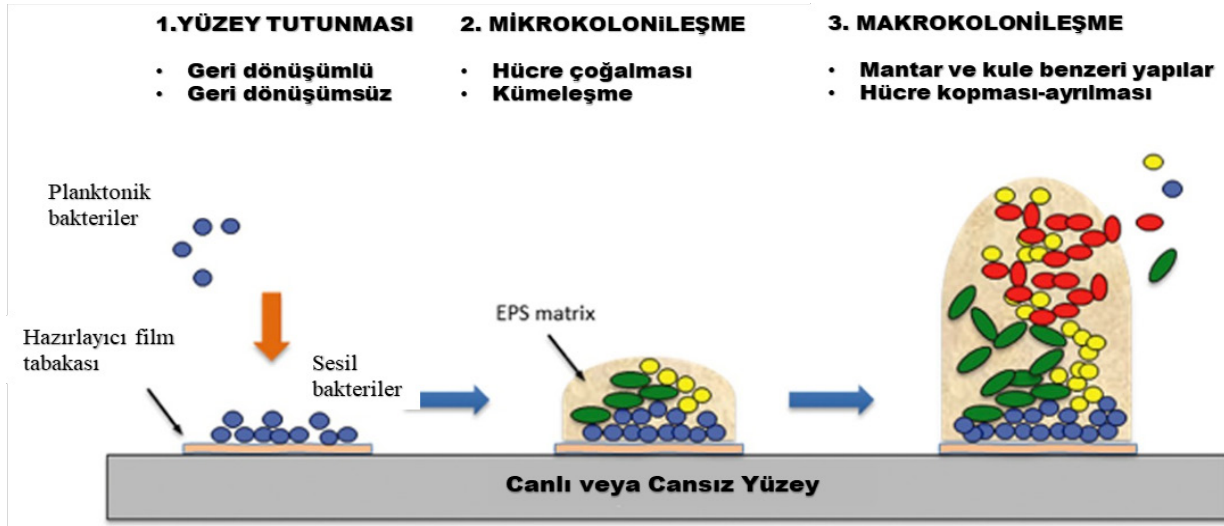
Biyofilmlerdeki bakteri hücreleri, nükleik asitler (DNA, RNA), polisakkaritler, lipidler ve proteinler gibi biyomolekülleri içeren kendi ürettikleri bir hücre dışı matris (ECM) içine gömülü şekildedir. ECM üretimi tüm biyofilmlerin ortak ilkesidir (Flemming ve Wiegand, 2010). Hücre dışı matrisin %3’ü matrisin anahtar bileşenleri olan polisakkaritler, proteinler, biyofilm yapısının oluşmasında rol oynayan ekstraselüler DNA (eDNA), RNA, peptidoglikan, lipidler, surfektanlar, Ca^{+2} ve benzeri iyonlar, glikolipitler, fosfolipidler ve membran keseciklerinden, %97’si ise besinleri, metabolitleri ve hücre parçalama ürünlerini absorbe eden sudan oluşmaktadır (Karatan ve Watnick, 2009). Biyofilmde hücrelerin kümelenmesi ve mikrokolonilerin oluşumu için gerekli olan ekzopolisakkaritlerin yapıları,

bileşenleri ve özellikleri birbirinden farklıdır. Ekzopolisakkaritler, biyofilmde diğer karbonhidratların, proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin yapışması için yapı iskeleti görevi görmektedirler (Rabin vd., 2015). eDNA, biyofilm yapısının oluşturulmasında ve stabilitenin sağlanmasında, proteinler ve proteinli ekler (pili, fimbria, curli), asidik ve hidrofobik amino asitlerin varlığı sayesinde bakteriyel adezyonda önemli bir rol oynamaktadır (Vasudevan, 2014).

Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşum süreci, ilgili organizma, diğer mikroorganizmaların varlığı, substratın doğası, besin bulunabilirliği, hidrodinamik koşullar, sıcaklık, tutunacağı yüzeyin özellikleri hücre yüzeyi özellikleri, pH ve ozmolarite gibi çok sayıda değişkene bağlıdır. Bu faktörler biyofilmin nihai yapısını etkilemektedir (Donlan, 2002).

Biyofilm oluşumu (Şekil 2) çok aşamalı bir süreçtir (Dufour, Leung ve Lévesque, 2012). İlk aşamasında mikroorganizmalar, biyofilm yapısı oluşturmadan besin aramak için temas yüzeylerine geri dönüşümlü olarak tutunmaktadır (Donlan, 2002). Bu aşamada yüzeye tutunması için mikrobiyal hücreleri kendine çeken, sert suda minerallerle birleşen gevşek karbonhidrat ve protein koleksiyonuna sahip bir hazırlayıcı tabaka oluşmaktadır (Choudhary, Singh ve Agarwal, 2020).



Şekil 2. Biyofilm oluşma aşamaları (Dufour vd., 2012).

Mikrobiyal hücrenin yüzeye çekildikten sonra, tüm materyaller için ortak olan itici güçlerin üstesinden gelmesi için flagella, pili, fimbria veya glikokaliks varlığı, mikrobiyal bağlanma oranını etkilemektedir. Bu eklentiler, daha kalıcı bağlanma mekanizmaları oluşana kadar hücrenin yüzeye bağlı kalmasını sağlamaktadır.

Hücre yüzeyinin hidrofobik olması da bağlanma için büyük önem taşımaktadır (Donlan, 2001; Kumar ve Anand, 1998). Buldukları ortamda geri dönüşümlü tutunmadaki zayıf etkileşimler, besin miktarı ve yüzeydeki çevresel koşullar yaşam için uygunsa, mikroorganizmalar iyonik ve kovalent bağlar gibi güçlü bağları kullanarak yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunurlar (Donlan, 2002). Bağlanma yüzeyinin yük, hidrofobiklik ve pürüzlülük gibi özellikleri, ilk bakteri yapışmasını belirlemektedir (Palmer, Flint ve Brooks, 2007). Ortaya çıkan elektrik yükü, hazırlayıcı tabaka oluştuğunda, ters yüke sahip bakterileri çeken ve mikrobiyal hücrelerin geri dönüşümsüz bağlanmasına neden olan yüzeyde birikmektedir (Choudhary vd., 2020). Geri dönüşümsüz tutunma aşamasında etkileşimler, hidrofobik, iyon-dipol, iyon-iyon, dipol-dipol, eş değerlikli bağlar ve hidrojen etkileşimi gibi

çeşitli kısa menzilli kuvvetlerdir (Zottola, 1994). Ayrıca hücreler tarafından salgılanan EPS'ler geri dönüşümsüz tutunmada hücrenin yüzeye yapışma oranını arttırarak, yüzeyden uzaklaşmasını zorlaştırmaktadır (Zhao, Zhao, Wang ve Zhong, 2017). Geri dönüşümsüz olarak yüzeye tutunan bakteri hücreleri çoğalarak biyofilmlerin temel yapı birimleri olan mikrokolonileri oluşturmaya başlamaktadır (Costerton, 1999; Huang, Li ve Gregory, 2011). Bu aşamada EPS'nin salgılanması ve mikroorganizmaların çoğalması ile birlikte hücrelerin çekirdek algılama (QS) molekülleri üretilerek hücreler arası iletişim sağlanıp EPS yapısı ve yoğunluk hakkında bilgi toplanmaktadır (Clutterbuck vd., 2007).

Quorum Sensing (QS), çoklu patojenik genlerin ekspresyonunu düzenleyen mikrobiyal bir sinyal sistemidir (Ohta vd., 2020). QS, bakteriyel gıda bozulma sürecinde ve aynı zamanda bakterilerin patojenitesinde yer alması nedeni ile gıda zehirlenmesi riskini arttırması sebebi ile gıda güvenliği ile yakından ilgilidir (Galiè vd., 2018). Et ürünleri, süt ürünleri çiğ sebzeler ve su ürünleri gibi farklı gıda maddelerinde çeşitli sinyal molekülleri tespit edilmiştir (Blana ve Nychas, 2014).

Biyofilm oluşumunun dördüncü basamağı olan olgunlaşma basamağında mikrokoloniler oluşturan mikroorganizmalar üç boyutlu kule veya mantar benzeri şekiller oluşturmaktadır (Taraszkiwicz, Fila, Grinholt ve Nakonieczna, 2013). Hücre-hücre etkileşimlerinin etkin olduğu bu süreçte, biyofilm bakterileri kendilerini planktonik benzerlerinden ayıran karakteristik fizyolojik özellikler sergiledikleri heterojen bir fizikokimyasal ortam meydana gelmektedir (Beloin, Roux ve Ghigo, 2008). Bu aşamada biyofilm ile ilgili bazı genlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Bu gen ürünleri, biyofilmin ana yapı malzemesi olan EPS için gereklidir. Matris oluşumunu, biyofilm içinde besinlerin taşınması için su dolu kanalların oluşumu izlemektedir. Su kanalları mikrokoloni topluluklarına besin dağıtan ve oluşan atıkları uzaklaştıran bir dolaşım sistemi görevine sahiptir (Parsek ve Singh, 2003). Biyofilm olgunlaşmasından sonra, dispersiyon adımı besin yokluğu, fazla nüfus, yoğun rekabet ve benzeri sayısız faktör nedeniyle aktif ya da pasif şekilde dağılmaktadır. Dağılma biyofilmin tamamında ya da bir parçasında meydana gelebilmektedir (Rabin vd., 2015).

Gıda İşletmeleri Açısından Biyofilm Varlığının Önemi

Biyofilmler gıda işletmelerinde ekonomik kayıplara ve gıda güvenliği sorunlarına sebep olabilmektedir. Mekanik parçaların tıkanarak çalışmalarının engellenmesi, ısı transferini azaltarak daha yüksek enerji tüketimine sebep olması ve yüzeylerdeki korozyon hızını arttırarak malzeme kaybına ve artan poroziteye sebep olmakla birlikte gıda ve gıda işleme ortamlarındaki varlığı da gıda kaynaklı hastalıklara yol açması nedeniyle ciddi bir halk sağlığı riskidir (Téllez, 2010). Ayrıca biyofilm aktivitelerinin gıdaların raf ömrünün kısalmasına, tadın ve diğer duyuşsal özelliklerin değişmesine de sebep olabileceği belirtilmektedir (Shi ve Zhu, 2009).

Biyofilmler gıda kaynaklı enfeksiyonların ana kaynağıdır. Biyofilm oluşturma, patojen bakterilerin gıda üretim alanlarında dondurma, tuzluluk, asidite, denzenfeksiyon gibi çevresel streslerden korunmasını sağlamaktadır (Brooks ve Flint, 2008). Gıda güvenliğini tehdit eden biyofilmler, çoğunlukla *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı enfektif bakteriler ile *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* gibi toksijenik bakteriler tarafından üretilmektedir (Chmielewski ve Frank, 2003; Galié vd., 2018). Bunun dışında gıdalarda bozunmaya neden olan *Pseudomonas* spp bakterileri de biyofilm oluşturmaktadır (Ünlü, 2020).

Gıda kaynaklı hastalıklar, gıda üretim ve servis hizmeti veren restoran ve benzeri işletmelerde uygunsuz gıda işleme uygulamalarıyla ilişkilendirilmektedir. Gıda kaynaklı bulaşmalara en fazla sebep olan gıda hazırlama uygulamaları; gıda üretim alanının yetersiz temizliği, yetersiz pişirme, kontamine olmuş ekipmanlar, uygun olmayan saklama sıcaklıkları ve güvenli olmayan kaynaklardan alınan hammaddeler, personelin yanlış uygulamaları ve çapraz bulaşma olarak sıralanabilmektedir (Çakıroğlu ve Uçar, 2008). Biyofilmlerin en çok görüldüğü yüzeyler su, süt ve diğer sıvı boru hatları, pastörizatör plakaları, ters ozmoz membranları, masalar, çalışan eldivenleri, karkaslar, temas yüzeyleri, ambalaj malzemeleri, hammaddeler ve katkı maddeleri için depolama siloları, dağıtım boruları, giderler vb. olarak sıralanmaktadır (Camargo, Woodward, Call ve Nero, 2017). Biyofilmler özellikle temizlik uygulamasının tam olarak yapılmadığı kör nokta (drenajlar, duvarlar ve tavanlar, boru hatları, pompalar, vanalar, contalar, köşeler, bağlantılar vb.) diyebileceğimiz alanlarda oluşmaktadır (Giaouris ve Simões, 2018). Ayrıca biyofilm yapısından ayrılan hücrelerin gıdanın temas ettiği kontamine yüzeyler veya kontamine ekipmandan kaynaklanan aerosol-

lerde bulunması da bulaşmaya sebep olmaktadır (Reij ve Den Aantrekker, 2004).

Biyofilm İçi Antimikrobiyal Direnç

Biyofilmlerde düşük difüzyon, anaerobik gelişme, mikroorganizmaların azalan büyüme oranına bağlı fizyolojik değişiklikler ve antimikrobiyal maddeleri bozan enzimlerin üretimi gibi biyofilmin yapısal ve fizyolojik özellikleri antimikrobiyal direnç oluşmasına neden olmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002; Winkelströter, Teixeira, Silva, Alves ve De Martinis, 2014). Planktonik mikroorganizmalara oranla antimikrobiyallere karşı 10-1000 kez daha güçlü olan biyofilmlerin çeşitli korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Biyofilmde EPS'nin antimikrobiyallerle etkileşime girebilen bir polimer olarak matrise gömülü hücrelere ulaşmadan önce antimikrobiyallerin nüfuzunu engellediği ve aktivitelelerini baskılayabildiği ya da antimikrobiyallere bağlanıp difüzyonlarını geciktirerek veya onlarla kimyasal olarak reaksiyona girerek inaktivasyonlarına neden olduğu düşünülmektedir (Araújo, Lemos, Mergulhão, Melo ve Simões, 2011). Biyofilm hücreleri kendilerini planktonik hücrelerden ayıran fizyolojik olarak ifade eden spesifik direnç genlerine de sahiptir. Biyofilmler özellikle iç katmanlarda besin ve oksijenin azaldığı durumlarda hayatta kalabilir ve düşük metabolik faaliyetler nedeni ile antimikrobiyallerin etkilerinden korunabilmektedir (Abdallah, Benoliel, Drider, Dhulster ve Chihib, 2014). Biyofilmlerin antibiyotik duyarlılığı ile ilgili çalışmalarda, karma tür biyofilmlerde tek tür biyofilmlere kıyasla genellikle daha yüksek direnç gözlemlenmiştir (Simões, Bennett ve Rosa, 2009). Bunların dışında, β -laktamaz ve benzeri enzim aracılı direnç, hedef bölgelerin gizlenmesi, akış pompaları kullanılarak antibiyotik ekstrüzyonu, Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi dış zar yapısının varlığı bilinen direnç mekanizmaları olarak sıralanabilmektedir (Abebe, 2020).

Biyofilmlerin Kontrolü ve Önlenmesi

Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) sistemi, yemek servisi yapan işletmelerde gıda kontaminasyonunu ve mikrobiyal üremeyi önlemek için yararlı bir araç olarak kabul edilmektedir (Valero vd., 2016).

Biyofilmin oluşmasının engellenmesi, oluşmuş biyofilmin gideriminden daha etkili bir yaklaşım olduğu belirtilmektedir (Simões, Simões ve Vieira, 2010; Zhao vd., 2017). Biyofilm oluşmasının engellenmesi (i) bakteriyel yüzey yapışmasının veya başlatma adımının inhibisyonu; (ii) Quorum Sensing sistemine müdahale; (iii) ikinci nükleotid haberci sinyal molekülleri ile modülasyon; (iv) biyofilm olgunlaşmasının kimyasal olarak engellenmesi ve (v) olgun biyofilmlerin bozulması gibi farklı adımlarda gerçekleştirilebilmektedir (Ghosh, Jayaraman ve Chatterji, 2020).

Günümüzde tek başına, yan etki oluşturmadan biyofilmleri başarılı bir şekilde önleyen ya da giderimini sağlayan bir strateji bulunmamaktadır. Temel biyofilm önleme stratejisi, bakteriler yüzeye yapışmadan düzenli temizlik ve dezenfeksiyon yapılmasıdır. Bunun yanında örneğin biyofilm dedektörleri ya da yüzey sensörleri kullanılarak biyofilmler daha olgunlaşmadan kontrolleri sağlanabilmektedir (Simões vd., 2010).

Olgun biyofilmlerin giderimi için pek çok yöntem bulunmaktadır (Zhao vd., 2017). Gıda işletmelerinde biyofilmlerdeki olgunlaşmış hücrelerin giderilmesi, fırçalama ve kazıma gibi etkili fiziksel işlemlerin yanı sıra enzim, deterjan, yüzey aktif madde, dezenfektan ve/veya ısı kullanılarak uygulanan kimyasal işlemler gerektirmektedir (González-Rivas, Ripolles-Avila, Fontecha-Umaña, Ríos-Castillo ve Rodríguez-Jerez, 2018).

Mevcut biyofilmleri ortadan kaldırmak için kullanılan geleneksel yöntemler dışında çe-

şitli, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler bulunmaktadır. Fiziksel yöntemler, soğuk plazma, iyonize radyasyon, süper-yüksek manyetik alanlar, ultrason uygulamaları, moleküler fırçalar, yüksek darbeli elektrik alanları ve biyositlerle kombine edilmiş düşük elektrik alan uygulamalarını içermektedir (Kumar ve Anand, 1998; Van Houdt ve Michiels, 2010). Biyolojik yöntemler daha yüksek etkinlik, daha düşük toksisite, daha fazla sürdürülebilirlik ve daha az bakteriyel direnç gelişimine sebep olmaktadır. Bu yöntemlerin en önemli örnekleri; quorum quenching (QQ), enzimler; enerji ayrıştırma, hücre duvarı hidrolizi ve bakteriyofajların kullanımı gibi uygulamalardır (Malaeb vd., 2013). İki veya daha fazla kontrol yönteminin kombinasyonu olan engel teknolojisi, biyofilm hücrelerini gıda işleme alanlarından etkili bir şekilde uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntemdir (Khan, Tango, Miskeen, Lee ve Oh, 2017). Bu yöntemlerin pek çoğu konvansiyonel olarak kullanılmamaktadır.

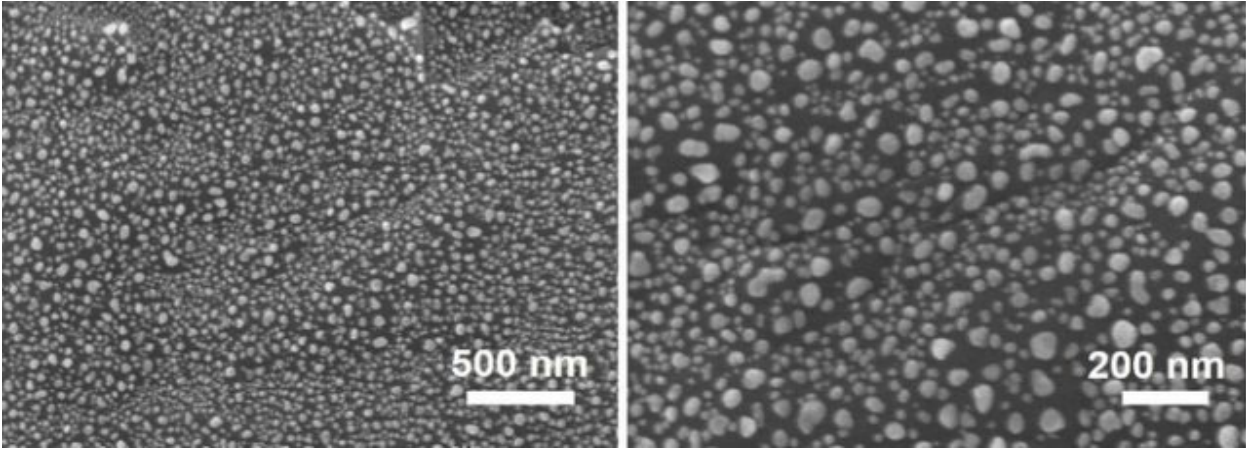
Dezenfeksiyon işlemi gıda endüstrisinde, geleneksel olarak fiziksel yöntemlerden ısı yoluyla (sıcak su veya buhar şeklinde) ve genellikle halojenler, kuaterner amonyum bileşikler, amfoterik ürünler, asitler, biguanidler, iyodoforlar, peroksijenler ve benzerleri gibi sıvı kimyasallar (dezenfektanlar) uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir (Holah, 1995; González-Rivas vd., 2018). Geleneksel antimikrobiyallere dirençli bakterilere karşı, yeni biyofilm kontrol stratejileri gerekmektedir (Zhao vd., 2017).

Gümüş Nanopartiküller

Nanoteknolojinin gıda sanayinde kullanımı, işleme, paketleme, gıda güvenliği ve fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi uygulamaları olarak özetlenmektedir. NP'ler, gıda sanayinde, biyoyararlılığı ve besin emilimini arttırmak için biyokatalizatör, antimikrobiyal, lezzet geliştirici veya viskozite kontrolü vb.

amaçlarla gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra raf ömrü ve diğer özellikleri korumak amaçlı paketleme materyallerinde kullanıldıkları gibi gıdalardaki sıcaklığı ve nemi kontrol etmek için nano sensör olarak ya da mikrobiyal gelişimi engellemek için pek çok alanda NP'lere başvurulmaktadır (Patel, Patra, Shah ve Khedkar, 2018).

Nanoteknolojinin gelişmesi ile nanomateryaller ilaca dirençli enfeksiyonları tedavi etmek için etkili bir alternatif antimikrobiyal strateji haline gelmektedir. Fonksiyonel NP'ler, hücre çevresine antimikrobiyal ajanların taşınma oranını artırma veya alternatif olarak matris dispersiyon ajanlarını taşıma yeteneğinin geliştirilmesini sağlamaları ile biyofilmleri kontrol etmek veya ortadan kaldırmak için umut verici bir teknoloji ürünüdür. NP'ler hem biyofilm oluşumunun engellenmesi hem de bir yüzeyde oluşmuş biyofilmlerin yok edilmesi için kullanılabilir (Gonçalves, da Silva, Signini ve Naves, 2017). NP'ler 100 nm'den küçük parçacıklar olup (Şekil 3), Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteleri; geniş yüzey alanı- hacim oranlarından kaynaklanan benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlanmaktadır (Kim vd., 2007; Wang vd., 2016). Gümüş NP'lerin, bakteri, virüs ve diğer ökaryotik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinlik açısından etkili NP olduğu kanıtlanmıştır (Gong vd., 2007). Gümüş NP'lerin birçok biyolojik engeli aşma ve reaktif oksijen türleri üretme kapasitesi bulunmaktadır (Marambio-Jones ve Hoek, 2010). Gümüş NP'lerin antibakteriyel etkinliği, konsantrasyonuna ve tutulma süresine göre farklılık göstermektedir.



Şekil 3. *Areca catechu*'nun yaprak ekstresi kullanılarak sentezlenen gümüş NP'lerin SEM mik-rografları (Shruthi, Prasad, Vinod, Balamurugan ve Shivamallu, 2017)

Gümüş NP'ler hücre zarına bağlanmaktadır ve bakteri içine nüfuz etmektedir, daha sonra bakteri zarında bulunan kükürt içeren proteinler ve hücrelerdeki DNA gibi fosfor içeren bileşiklerle etkileşime girmektedir. Partiküllerin DNA'nın replikasyon yeteneğini kaybetmesine sebep olduğuna ve hücre proteinlerinin gümüş NP uygulamasında inaktive olduğuna inanılmaktadır (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004). Ayrıca hücre zarında zarın geçirgenliğini arttıran yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Gümüş NP'ler bakteri hücrelerine girdiğinde, merkezinde düşük moleküler ağırlıklı bir bölge oluşturur, tercihen solunum sistemine ve hücre bölünmesine saldırarak hücre ölümüne yol açmaktadır. NP'ler bakteri hücreleri içinde bakterisidal aktivitelerini arttıran gümüş iyonları salgılamaktadır (Feng vd., 2000; Morones vd., 2005; Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

Ayrıca bakteri hücrelerinin ölümüne neden olan bir diğer gümüş NP mekanizması gümüş NP'ler tarafından serbest radikallerin oluşturulması olarak değerlendirilebilmektedir. Gümüş NP'ler bakterilerle temas ettiğinde serbest radikallerin oluştuğunu ve bu serbest radikallerin hücre zarına zarar verdiğini ve hücrenin ölmesine yol açabilen gözenekli hale getirebildiğini öne süren elektron spin rezonans

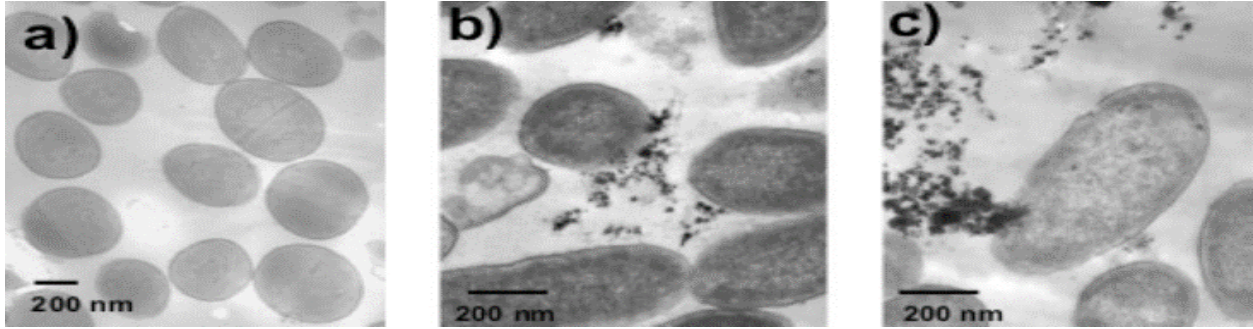
spektroskopi çalışmaları yapılmaktadır (Kim vd., 2007). Gümüş NP'lerin bakteriyel dirençe neden olmamasına antibiyotiklerin aksine, gümüş NP'lerin antibakteriyel etkilerini yalnızca belirli bir bölgede değil, bakteri duvarı, proteosentez ve DNA gibi birkaç derecede göstermesinin sebep olduğu düşünülmektedir (Morones vd., 2005; Shrivastava vd., 2007). Morones vd. (2005) gümüş NP'lerin, bakteri hücrelerine girişini ve kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında (Şekil 4) hücre zarında oluşturduğu gözle görülür hasarı göstermişlerdir.

Gümüş NP'lerin bakteriyel biyofilmler üzerine etkileri üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Sondi ve Salopek-Sondi (2004) gümüş NP'lerin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisini araştırdıkları çalışmada katı ve sıvı ortamlar kullanmışlardır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre katı yüzeyde çok etkili olan gümüş NP'ler sıvı ortamda sadece *E. coli* gelişimini geciktirebilmişlerdir. Bu durumun sebebi olarak bu partiküllerin düşük kolloidal dayanıklılığı gösterilmiştir.

Kalishwaralal ve ark. (2010) gümüş NP'lerin *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus epidermidis* suşlarına karşı antibiyofilm aktivitesini analiz ettikleri çalışmalarında, 100 nm boyutunda gümüş NP'ler ile 24 saat inkübasyon sonra-

sında oluşan biyofilm miktarının %98 oranında inhibe edildiğini gözlemlenmişlerdir. 50 nm boyutunda gümüş NP ile inkübasyon sonrasında ise biyofilmin ekzopolisakkarit içeriğinin azal-

tıldığı, bakteriyel canlılığın etkilenmemesine rağmen biyofilm oluşumunun inhibe edildiği belirtilmiştir.



Şekil 4. Farklı büyüklüklerdeki *P. aeruginosa* örneğinin TEM görüntüleri. (a) Kontrol numunesi; (b) ve (c) daha önce gümüş NP'ler ile muamele edilmiş numuneler (Morones vd., 2005).

Namasivayam ve Allen Roy (2013) tarafından geliştirilen gümüş NP'lerin, biyofilmi zayıflattığı ve ilaçların penetrasyonunu engelleyen biyofilm matrisinin karbonhidrat ve protein içeriğini azalttığı ifade edilmiştir. Son yıllarda, gümüş hidrojen peroksit ile birlikte dezenfektan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Scenihr, 2014). Davoudi ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada 30 ppb gümüş içeren %0,3'lük hidrojen peroksit solüsyonunun *E. coli*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri üzerine antimikrobiyal etkinliği test edilmiş ve bu patojenlere karşı kombinasyonlarının çok güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Diğer çalışmalarda, düşük H_2O_2 ve Ag^+ konsantrasyonlarının *Enterobacteriaceae* ve toplam bakteri sayısını azalttığını bildirilmiştir. Armon ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada 30 ppm hidrojen peroksit ve 30 ppb gümüş iyonu kombinasyonunun biyofilm büyümesini önlemede tek başına hidrojen peroksit ya da tek başına gümüş iyonlarından daha etkili ve 1 ppm klor solüsyonunun biyofilm önleme etkinliğinin hazırlanan kombine dezenfektandan daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Shrivastava ve ark (2007)'nin yaptıkları çalışmada gümüş NP'lerin antimikrobiyal etkisinin Gram negatif bakterilere karşı Gram pozitiflerden daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Sonuç

Sonuç olarak biyofilmler gıda işletmelerinde meydana gelebilen ve halk sağlığı açısından büyük etkileri olan istenmeyen oluşumlardır. Aynı zamanda, işletmelere ekonomik açıdan da büyük yük getirmektedirler. Yapılarında bulunan mikroorganizmaların değişik türlerden ve cinslerden oluştuğu da bilinmektedir. Bundan dolayı farklı oranlarda oluşacak antimikrobiyal direnç de biyofilm ile savaşta göz önüne alınmalıdır. Gümüş NP'ler olası bir direnç tetiklemedikleri ve halk sağlığı açısından risk oluşturmadıkları için değerli antimikrobiyal yapılardır. Gümüş NP'lerin kullanımı hem kolay hem de diğer tekniklerle beraber yapıldığında katma değer sağladığından hızlı biçimde hayata geçmektedir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2019-34310.

Kaynakça

Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, B., Hemmateenejad, A., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., Sharghi, H. (2015). The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative Bacteria: a preliminary study. Hindawi Publishing Cor-

poration *Journal of Nanomaterials*, 16(1), 53. DOI:10.1155/2015/720654

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), 453–472.

Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic assistance and food contamination, Review Article. *International Journal of Microbiology*, 2020 (281). DOI:10.1155/2020/1705814

Alsayeqh, A. F. (2010). Possible factors for food safety infraction and fraud continuity in restaurants in Saudi Arabia. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 61(146), 154-169.

Araújo, P.A., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms to disinfectants. In: Méndez-Vilas A, (Eds). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances (pp. 826– 834). Bada-joz: Formatex

Armon, R., Laot, N., Lev, O., Shuval H., Fattal B. (2000). Controlling biofilm formation by hydrogen peroxide and silver combined disinfectant. *Water Science and Technology*, 42, 187-92.

Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J. M. (2008). Escherichia coli biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249–289.

Blana, V.A., Nychas, G. J. E. (2014). Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 1-8.

Brooks, J.D., Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2163-2176.

Bower, C.K., McGuire, J., Daeschel, M.A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 152–157.

Camargo, A.C., Woodward, J.J., Call, D.R., Nero, L.A. (2017). Listeria monocytogenes in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14, 623-636.

Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.

Choudhary, P., Singh, S., Agarwal V. (2020). Microbial biofilms. In: Bacterial Biofilms, IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.90790

Clutterbuck, A. L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. A., Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 1-17.

Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3–4), 217-221.

Çakıroğlu, F. P., Uçar, A. (2008). Employees' perception of hygiene in the catering industry in Ankara (Turkey). *Food Control*, 19, 9-15.

Davoudi, M., Ehrampoush, M. H., Vakili, T., Absalan, A., Ebrahimi, A. (2012). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and silver composition on selected pathogenic enterobacteriaceae. *International Journal of Environmental Health Engineering*, 2012, 1-23. DOI: 10.4103/2277-9183.96148

Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. DOI:10.1086/322972

- Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-90.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C.M. (2012).** Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., Kim, J. O. (2000).** A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662-668.
- Flemming, H.C., Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Galiè, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J., Lombo, F. (2018).** Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898.
- Ghosh, A., Jayaraman, N., Chatterji, D. (2020).** Small-molecule inhibition of bacterial biofilm. *ACS Omega*, 5(7), 3108–3115. DOI: 10.1021/acsomega.9b03695
- Giaouris, E. E., Simões, M. V. (2018).** Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. İçinde: Holban, A. M., Grumezescu, A. M. (Eds): Handbook of Food Bioengineering, Foodborne Diseases (pp.309-377). UK: Elsevier Academic Press
- Gonçalves, R.C., da Silva D. P., Signini, R., Naves, P. L. F. (2017).** Inhibition of bacterial biofilms by carboxymethyl chitosan combined with silver, zinc and copper salts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 385-392. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.048
- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., Zhang, S., Yang, X. (2007).** Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄-Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, 285604–285610.
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., Rodríguez-Jerez, J. J. (2018).** Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1261-1276.
- Holah, J.T. (1995).** Special needs for disinfectants in food-handling establishments. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, 14, 95-104.
- Huang, R., Li, M., Gregory, R. L. (2011).** Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
- Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, T., Otani, K.S., Kobayashi, H. (1998).** In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1641–1645.
- Jones, T.F., Angulo, F.J. (2006).** Eating in restaurants: A risk factor for foodborne disease? *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1324-1328.
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R., Deepak, V., Gurunathan, S. (2010).** Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 340-344. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.014.
- Karatan, E., Watnick, P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347.
- Khan, I., Tango, C.N., Miskeen, S., Lee, B.H., Oh, D.H. (2017).** Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety—A review. *Food Control*, 73, 1426–1444.

- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H. (2007).** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3, 95–101.
- Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998).** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Malaeb, L., Katuri, K.P., Logan, B.E., Maab, H., Nunes, S.P., Saikaly, P. E. (2013).** A hybrid microbial fuel cell membrane bioreactor with a conductive ultrafiltration membrane biocathode for wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 47 (20), 11821-11828.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. (2010).** A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman, M. J. (2005).** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346–2353. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059
- Namasivayam, K. R., Allen Roy, E. (2013).** Anti biofilm effect of edicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 5(2), 486-489.
- Ohta, A., Fukumoto, A., Iizaka, Y., Kato, F., Koyama, Y., Anzai, Y. (2020).** Quorum sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026 derived from an actinomycete metabolite library. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(1), 179-183.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. (2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.
- Parsek, M. R., Singh, P. K. (2003).** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677-701.
- Patel, A., Patra, F., Shah, N., Khedkar, C. (2018).** Application of nanotechnology in the food industry: Present status and future prospects. In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.) *Handbook of Food Bioengineering, Impact of Nanoscience in the Food Industry* (pp. 1-27). London: Academic Press
- Pulit-Prociak J., Banach M. (2016).** Silver nanoparticles—a material of the future? *Open Chemistry*, 14, 76–91.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O. (2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.
- Reij, M.W., Den Aantrekker, E.D. (2004).** Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91 (1), 1-11.
- Scenihr (2014).** Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified. Health Risks. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_039.pdf
- Simões, M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. S. (2009).** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26(6), 746-757.
- Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Shi, X., Zhu, X. (2009).** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 407-413.

- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007).** Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18, 225103-225111.
- Shruthi, G., Prasad, K. S., Vinod, T. P., Balamurugan, V., Shivamallu, C. (2017).** Green synthesis of biologically active silver nanoparticles through a phytomediated approach using areca catechu leaf extract. *ChemistrySelect*, 2,32, 10354–10359, DOI:10.1002/slct.201702257.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004).** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 177-182.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., Nakonieczna, J. (2013).** Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research International*, 2013: 150653. DOI: 10.1155/2013/150653.
- Téllez, S. (2010).** Biofilms and their impact on food industry. *VISAVET Outreach Journal*. <https://www.visavet.es/en/articles/biofilms-impact-food-industry.php>
- Ünlü, G. (2020).** Bacterial biofilms: Formation, prevention and control. *Food Technology Magazine*, 74 (10). <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2020/october/columns/food-safety-and-quality-bacterial-biofilms-formation-prevention-and-control>
- Valero, A., Rodríguez, M.-Y., Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M. (2016).** Risk factors influencing microbial contamination in food service centers. In: Makun, H.A. (Ed), Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases (pp. 28-58). Intech. DOI: 10.5772/63029
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. (2010).** Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117-1131.
- Vasudevan, R. (2014).** Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 1(3), 84-98.
- Wang, C., Kim, Y. J., Singh, P., Mathiyagan, R., Jin, Y., Yang, D. C. (2016).** Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus* and their antimicrobial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(4), 1127-32.
- Wilson, D. J. (2012).** Insights from genomics into bacterial pathogen populations. *PLOS Pathogens*, 8(9), e1002874. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002874
- Winkelströter, L. K., Teixeira, F. B., Silva, E. P., Alves, V. F., De Martinis, E. C. (2014).** Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology*, 68(1), 35-46.
- Yang L., Liu Y., Wu H., Hoiby N., Molin S., Song Z. J. (2011).** Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3, 74–81.
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., Zhong, N. (2017).** Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58), 36670-36683.
- Zottola, E.A. (1994).** Scientific status, summary, microbial attachment and biofilm formation, a new problem for food industry. *Food Technology*, 48, 107–114.