



Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Dursun Alp GÜNDOĞ¹✉, Güven GÜNGÖR², Candan GÜNGÖR¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹,
 Zafer GÖNÜLALAN¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 26.04.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 29.05.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Gündoğ DA, Güngör G, Güngör C, Onmaz NE ve Gönülalan Z. Çeşitli Gıda Kaynaklı Patojenik Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):18-26.

Özet: Bu çalışmada, çeşitli gıda kaynaklı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde Kongo Kırmızısı Agar'ın (KKA) duyarlılığını ve özgülüğünü mikroplak (MP) yöntemi ile kıyaslanarak belirlemek amaçlandı. Çalışma kapsamında, çeşitli gıda ve çevre örneklerinden elde edilen 36 *Staphylococcus aureus*, 30 *Listeria* spp., 35 *Escherichia coli* ve 34 *Salmonella* spp. olmak üzere toplam 135 izolatın biyofilm oluşturma yetenekleri KKA ve MP yöntemleri kullanılarak belirlendi. İki yöntemin sonuçları arasındaki uyum Kappa uyum katsayısı hesaplanarak araştırıldı. İncelenen izolatların %51.1'inin KKA'da, %53'ünün ise MP'de biyofilm ürettiği tespit edildi ($P>0.05$). *Listeria* spp. *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. izolatlarının sırasıyla KKA'da %60, %97,2, %11.4 ve %35.2'ü; MP'de ise %56.6, %100, %22.8 ve %32.3'ü biyofilm pozitif olarak tespit edildi ($P>0.05$). KKA yöntemi sadece *S. aureus*'da yüksek duyarlılığa (%97) sahip bulunurken; diğer suşlarda duyarlılık daha düşük bulundu. Özgülük değerleri *Listeria* spp.'da %39, *Salmonella* spp.'da %59 ve *E. coli*'de %89 olarak tespit edildi. Bu değerler MP yönteminde elde edilen değerlerden daha yüksekti. Sonuç olarak, KKA yönteminin duyarlılığının bakteri türüne göre değişkenlik gösterdiği; bu nedenle bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespit edilmesinde KKA ve MP yöntemlerinin birlikte uygulanmasının yararlı olacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Gıda patojenleri, Kongo kırmızısı agar, Mikroplak

Comparison of the Efficacy of Congo Red Agar in Detection of Biofilm Forming Abilities of Various Foodborne Pathogenic Bacteria

Abstract: In this study, the sensitivity and specificity of Congo Red Agar (CCA) were compared with Microplate (MP) method to assess the biofilm-forming abilities of various foodborne pathogenic bacteria. A total of 135 isolates (36 *Staphylococcus aureus*, 30 *Listeria* spp., 35 *Escherichia coli*, and 34 *Salmonella* spp.) obtained from different food and environmental samples were examined. The agreement between the results obtained from the two methods analyzed using the Kappa coefficient of agreement. The findings showed that 51.1% of the isolates tested positive for biofilm formation using CCA, while 53% tested positive using MP ($P>0.05$). When considering individual bacterial species, the percentages of biofilm-positive isolates were 60% for *Listeria* spp., 97.2% for *S. aureus*, 11.4% for *E. coli*, and 35.2% for *Salmonella* spp. using CCA, and 56.6%, 100%, 22.8%, and 32.3% using MP, respectively ($P>0.05$). The CCA method exhibited high sensitivity (97%) specifically for *S. aureus*, while its sensitivity was lower for other bacterial strains. The specificity values were 39% for *Listeria* spp., 59% for *Salmonella* spp., and 89% for *E. coli*, which were higher against the MP method. Therefore, it was concluded that the sensitivity of the CCA method varied depending on the bacterial species, suggesting that the combined application of CCA and MP methods would be beneficial in determining the biofilm-forming abilities of different bacteria.

Keywords: Biofilm, Congo red agar, Food pathogens, Microplate

1.Giriş

Biyofilmler, bir yüzeye veya birbirine tutunarak kendi ürettikleri bir ekzopolisakkarit (EPS) matriks içine gömülmüş mikroorganizma topluluklarıdır. EPS'nin yapısını polisakkaritler, proteinler, glikolipidler ve hücre dışı DNA (eDNA) oluşturmaktadır (1). Biyofilm matriksinin yapısında %97 su, %2-5 oranında mikrobiyal hücre, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve RNA bulunmaktadır (2, 3). Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında, mikroorganizmanın fimbriya veya flagella gibi uzantılarıyla bir yüzeye

tutunurlar. Ortamda yeteri kadar besin maddesi var ise bakteri hücresi, tutunduğu yüzeyde koloni oluşturmaya başlar. Bu aşamada ortamda bulunan diğer mikroorganizmalarda eş zamanlı olarak koloni oluşturur. İlerleyen aşamalarda, mikrokoloniler salgıladıkları EPS yapısı içerisinde topluluk oluşturarak karakteristik üç boyutlu biyofilm yapısı ile olgun biyofilme dönüşürler. Biyofilm yapısı içerisinde, popülasyonunun artması, besin kaynağı eksikliği ve oksijen yetersizliği gibi rekabet

faktörlerine bağlı olarak kopmalar gerçekleşir. Kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odakları oluşturabilir (2, 3). EPS'nin yapısında bulunan polisakkaritler; mikroorganizmaların yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumundan, proteinler; biyofilm oluşturan bakteriler arasındaki iletişimin sağlanmasından, glikolipidler; mikroorganizmaların virülans özellikler edinmesinden, eDNA; bakteri hücreleri arasında yatay gen transferi ve biyofilm topluluğunun üç boyutlu bir yapı geliştirmesinden sorumludur (4, 5). Mikroorganizmaların hayatta kalmaları için geliştirdikleri en önemli stratejilerden biri olan biyofilmin gramında yaklaşık 108-1011 hücre bulunmaktadır (6). Biyofilm matriksi içerisinde yer alan EPS'ler bir bariyer görevi görerek mikroorganizmaları dezenfektan, antibiyotik, UV ışını, konak immün yanıtı ve diğer dış etkenlere karşı korumaktadır (7).

Biyofilmdeki mikroorganizmalar, planktonik durumdaki mikroorganizmalara göre antibiyotiklere yaklaşık 1000 kat daha dirençli olabilir (8, 9). Biyofilm içindeki mikroorganizmalar arasında plazmidler aracılığı ile gerçekleşen horizontal gen transferi, virülans veya antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır (10). Bakteriye enfeksiyonların %60'ından fazlası biyofilm oluşumu fenomeni ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (11). Gıda üretim ve depolama alanları, özellikle et ve süt işletmeleri, yağlar, proteinler ve karbonhidratlar açısından zengin atık içermelerinden ötürü mikrobiyal tutunma ve biyofilm oluşturma açısından uygun ortamlardır. Patojen mikroorganizmalar, gıda işletmelerine ait yüzeylere (tahta, cam, paslanmaz metal, plastik) tutunup kalıcı hale gelerek önemli bir kontaminasyon kaynağı olmaktadır (12). Gıda işletmelerinde, gıda ile temas eden metal yüzeylerde biyofilm oluşumu, korozyon ve tıkanmalara sebep vererek işleme prosedürünün aksamasına ve gıda güvenliği ile kalitesinde ciddi sorunlara neden olur (13,14). Birçok Gram-pozitif patojen bakteri (*Listeria* spp, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) ve Gram-negatif patojen bakteri (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella* spp.) biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (15-20).

Biyofilm oluşumunu tespit etmek için doku kültürü plakası (Tissue culture plate, TCP), tüp yöntemi (Tube method, TM), Kongo kırmızı agar (KKA), mikroplak (MP) yöntemi, floresan mikroskopik inceleme, taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM), konfokal lazer taramalı mikroskop (confocal laser scanning microscope, CSLM) ile inceleme gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. SEM ve CSLM teknikleri biyofilm yapısının varlığını ve üç boyutlu yapısını görüntülemeye

kullanılmaktadır ancak pahalı ve kantitatif değerlendirmede zayıf kalmaktadır. Biyofilm yapısını kristal viyole boyama yolu ile gerçekleştirilen yöntemlerde (TCP, TM, MP) ise tekrarlı yıkama aşamaları sonucu hücre kaybı ve biyofilm yapısını olumsuz etkilemesi gibi dezavantajlarına karşın ucuz ve kantitatif olarak iyi sonuç vermektedir. KKA yöntemi ise kolay ve ucuz bir yöntem olmasına karşın kantitatif ölçüm sağlayamamaktadır (21-23).

Biyofilm yeteneğine sahip patojen bakteriler ile ilgili risklerin önlenmesine yönelik en önemli aşamalardan birisi etkenin erken ve hızlı tespitidir. Bu çalışmada, gıda endüstrisinde halk sağlığı açısından risk oluşturan önemli patojenlerden Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Listeria* spp.) ve Gram negatif (*Escherichia coli* ve *Salmonella* spp) bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde ucuz ve kolay bir yöntem olan KKA'nın duyarlılık ve özgüllüğünün araştırılması ve sonuçların MP yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

2.1 Bakteriler

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 135 adet izolat (36'sı *S. aureus*, 35'i *E. coli*, 30'u *Listeria* spp., ve 34'ü *Salmonella* spp.) kullanıldı (Tablo 1). Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara, PZR analizi ile *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. izolatları sırasıyla *nuc*, *trpA*, *invA* ve *iap* genlerinin varlıkları sırasıyla Ertaş ve ark. (24), Clermont ve ark (25), Rahn ve ark. (26) ve Al ve ark. (27) tarafından belirtilen primer çiftleri kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla, %10 gliserollü Brusella broth içerisinde -20°C'de muhafaza edilen izolatlara, kanlı agar ekilerek 37 °C'de 24 h inkübe edilerek, saf kültürleri elde edildi. Inkübasyon süresi sonunda izolatların DNA'ları Genomik DNA İzolasyon Kiti (InstaGene™ Matrix-7326030, Bio-Rad, ABD) kullanılarak kit protokolüne göre ekstrakte edildi. Reaksiyon karışımı; toplam hacim 25 µL olacak şekilde 12,5 µL 2x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo scientific™-K1081, ABD), 6 µL nükleaz içermeyen su, her primerden 1 µL ve 2 µL DNA olacak şekilde hazırlandı. PCR Reaksiyonu, 94°C'de 3 dk ilk denatürasyon aşamasını takiben 35 siklus 94°C'de 30 s denatürasyon, 52.9-59 °C'de (*nuc*: 55°C, *trpA*: 59°C, *invA*: 53°C ve *iap*: 52.9°C) 30 s bağlanma, 72°C'de 1 dk uzatma aşamaları tamamlandıktan sonra, 72°C'de 2 dk son uzatma olarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. İzolatların elde edildiği ortam ve kaynaklar

Bakteri Türü	Örnekleme Yapıldığı Yer	İzole Edilen Kaynak	Örnek Sayısı
<i>Listeria spp.</i>	Mezbaha	Karkas	13
		Bıçak	5
		Konveyör	4
		Sucuk	4
		Atık su	1
	Mandıra	Süt	3
<i>E. coli</i>	Mezbaha	Salam	13
		Karkas	15
		Bıçak	5
		Çengel	2
<i>Salmonella spp.</i>	Mezbaha	Bıçak	3
		Konveyör	3
		Sığır Derisi	4
		Karkas	6
	Mandıra	Taze Peynir	18
<i>S. aureus</i>	Mezbaha	Çengel	3
		Bıçak	1
		Karkas	2
	Mandıra	Taze Peynir	4
		Kaşar Peyniri	6
		Süt	2
		Yoğurt	8
		Süt Tankı	8
		Zemin	2
Toplam			135

2.2. Çalışmada kullanılan Referans Suşlar

İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde, pozitif kontrol olarak güçlü biyofilm oluşturan *S. epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak ise biyofilm oluşturmeyen *S. epidermidis* ATCC 12228 suşu kullanıldı.

2.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Kabiliyetlerinin Belirlenmesi

Bu amaçla, bakterileri kolonilerinin morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumunun tespit edildiği kalitatif bir yöntem olan Kongo kırmızısı agar (KKA) ve kantitatif bir yöntem olan mikropalak (MP) yöntemleri kullanıldı.

2.3.1. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi

İzolatların biyofilm yapabilme özelliklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesi amacıyla Freeman ve ark. (28) tarafından bildirilen yöntemle göre KKA besiyeri kullanıldı. Bu amaçla, litresinde 50 g sakkaroz, 37 g Brain Heart Infusion (BHI, Merck 70138, Almanya) agar ve 0,8 g kongo kırmızısı (Merck 101340, Almanya) olacak şekilde besiyeri hazırlandı. Çalışma kapsamında kullanılan izolatlar, pozitif ve negatif kontrol suşları KKA besiyerine yayma plak tekniği ile ekildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda koloni morfolojisine göre değerlendirilen petripler oda ısısına alınarak 24 saat sonra tekrar değerlendirildi. Kuru opak siyah ve koyu kırmızı-siyah renkli koloniler biyofilm pozitif, pembe-kırmızı koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi. *Salmonella spp.* izolatlarında ise kuru-pürüzlü kırmızı, kahverengi ve pembe renkli koloniler biyofilm pozitif, düz ve beyaz koloniler ise negatif olarak kabul edildi. Kongo kırmızısı agar yöntemi her izolat için üç tekrarlı olarak uygulandı.

2.3.2. Mikroplak Yöntemi

İzolatların biyofilm üretiminin kantitatif ölçümü, Stepanović ve ark. (29) tarafından bildirilen mikroplak yöntemi ile yapıldı. İzolatlar, %2 glikoz (Merck 108342, Almanya) ilave edilen Triptik Soy Broth (TSB, Merck 105459, Almanya) içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürden 0,5 McFarland standardında ($\sim 1 \times 10^8$ kob/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Daha sonra düz tabanlı steril mikroplakların kuyucuklarına her bir bakteri süspansiyonundan 100 µL ve 100 µL TSB ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında plakaların içerikleri boşaltıldı ve 200 µL fizyolojik tuzlu su ile üç kez yıkanarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra her kuyucuğa 200µL %99'luk etanol ilave edilerek 15 dakika süre ile biyofilm yapan bakteriler fikse edildi. Fiksasyon işlemi takiben kuyucuklar boşaltılıp plakalar ters çevrilerek kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında kuyucuklar hazırlanan %2'lik kristal viyole (Merck 101408, Almanya) çözeltisi ile 5 dakika süre ile boyandıktan sonra distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Tutunan boyaların çözünmesi amacıyla kuyucuklara %33'lük glasiyal asetik asitten 160µL eklendi. Kuyucukların optik dansitesi (OD) ELISA okuyucu (MultiskanFC-51119000, Thermo, ABD) kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Çalışmada sadece steril TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol, güçlü biyofilm kabiliyetine sahip *S. epidermidis* ATCC 35984 inokule edilen TSB içeren kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her izolat için analiz üç kez tekrarlandı ve sonuçlar üç analizin ortalaması alınarak hesaplandı. ELISA cihazında, her bir izolat için elde edilen OD'ler, negatif kontrol kuyucukları için aşağıda belirtildiği gibi hesaplanan cut off" (sınır) değerleri ile karşılaştırılarak biyofilm varlığı ve derecesi belirlendi:

$OD_c = \text{negatif kontrolün ortalama OD'si} + (3 \times \text{SD negatif kontrol})$

$OD \leq OD_c$: Biyofilm negatif

$OD_c < OD \leq 2OD_c$: Zayıf biyofilm

$2OD_c < OD \leq 4OD_c$: Orta düzey biyofilm

$4OD_c < OD$: Güçlü biyofilm

2.4. İstatistiksel Analiz

KKA besiyerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde, MP yöntemi referans yöntem olarak kullanıldı (30). Test edilen izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri ile ilgili olarak MP ile KKA'dan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılık Pearson Ki kare testi ile değerlendirildi (31). İki yöntem arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı hesaplanarak belirlendi (30). Veri analizlerinde elde edilen $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizlerde Jamovi 2.3 paket programı kullanıldı. KKA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü ise aşağıda belirtilen formüller kullanılarak hesaplandı (32):

$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{Doğru Pozitiflik}}{\text{Doğru Pozitiflik} + \text{Yanlış Negatiflik}}$

$\text{Özgüllük} = \frac{\text{Doğru negatiflik}}{\text{Doğru negatiflik} + \text{Yanlış pozitiflik}}$

Doğru pozitiflik: Her iki yöntemde de biyofilm pozitif olan örnek sayısı

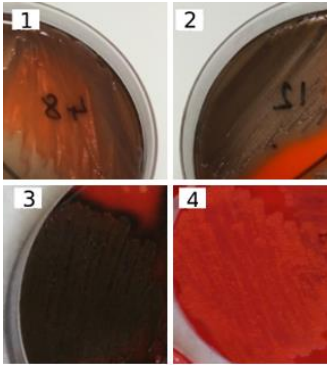
Doğru negatiflik: Her iki yöntemde de biyofilm negatif olan örnek sayısı

Yanlış pozitiflik: MP yönteminde negatif, KKA yönteminde pozitif çıkan örnek sayısı

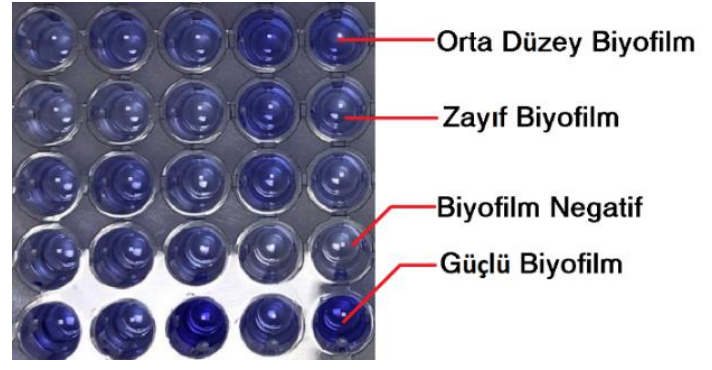
Yanlış negatiflik: MP yönteminde pozitif, KKA yönteminde negatif çıkan örnek sayısı

3. Bulgular

KKA yöntemine göre incelenen 135 adet izolatın 69 (%51)'u siyah koloni oluşturdu ve biyofilm pozitif, 66 (%49)'sı ise şeffaf/pembe renkli koloniye sahipti ve negatif olarak değerlendirildi (Şekil 1). MP yöntemine göre ise test edilen izolatların 72 (%53)'sü biyofilm pozitif, 63 (%47)'ü biyofilm negatif olarak tespit edildi. Biyofilm pozitif izolatların 22 (%30.6)'sü güçlü, 22 (%30.6)'sü orta ve 28 (%38.8)'i zayıf biyofilm üretme yeteneği gösterdi (Şekil 2). Ayrıca, analiz edilen 135 izolatın 47 (%34.8)'sü her iki yöntemde de biyofilm oluşturma yeteneği sergiledi. Bu verilere göre, izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespitine yönelik uygulanan yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi ($P > 0.05$).



Şekil 1. Biyofilm pozitif izolatların kongo kırmızısı agar ve Mikroplak görüntüleri. A; Biyofilm pozitif izolatların kongo kırmızısı agarda görünümü: **1;** *Listeria* spp., **2;** *E. coli*, **3;** *S. aureus*, **4;** *Salmonella* spp.



Şekil 2. Kristal viyole ile boyanmış mikroplaklarda farklı yoğunlukta biyofilm oluşumu

Gram pozitif bakterilerden *Listeria* spp. ve *S. aureus* izolatlarının sırasıyla 18 (%60)'i ve 35 (%97.2)'i KKA besiyerinde; 17(%56.6)'sı ve 36 (%100)'sı MP'de biyofilm pozitif idi. *Listeria* spp izolatlarının 10 (%33.3)'unda ve *S. aureus* izolatlarının 34 (%94.4)'ünde her iki yöntemin sonuçları uyumlu bulundu. Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *Salmonella* spp. izolatlarının sırasıyla 4 (%11.4)'ü ve 12 (%35.2)'si KKA'da; 8 (%22.8)'i ve 11 (%32.3)'i ise

MP'de biyofilm üreticisi olarak tespit edildi (Tablo 2). Uygulanan her iki teste de *E. coli* izolatlarının sadece biri (%2.9) ve *Salmonella* spp. izolatlarının ise 9'u (%26,5) biyofilm pozitif olarak uyumlu sonuç verdi. Çalışma kapsamında biyofilm üreticisi olarak belirlenen izolatların çoğunluğu karkas eti (KKA'da %41.7, MP'de %33.3) orjinli idi.

Tablo 2. Analiz edilen izolatların biyofilm oluşturma özellikleri

Analiz Edilen Türler		İzolatların Biyofilm Yapma Kabiliyetleri (%)				
		KKA	MP			
			Total	Zayıf	Orta	Güçlü
Gram (+) n=66	<i>Listeria</i> spp. (n=30)	18 (%60)	17 (%56.6)	16 (%94.1)	1 (%5.9)	-
	<i>S. aureus</i> (n=36)	35 (%97.2)	36 (%100)	1 (%2.8)	14 (%38.9)	21 (%58.3)
Gram (-) n=69	<i>E. coli</i> (n=35)	4 (%11.4)	8 (%22.8)	5 (%62.5)	2 (%25)	1 (%12.5)
	<i>Salmonella</i> spp. (n=34)	12 (%35.2)	11 (%32.3)	6 (%54.5)	5 (%45.5)	-
Toplam (n=135)		69 (%51.1)	72 (%53.3)	28 (%38.8)	22 (%30.6)	22 (%30.6)

n: Numune sayısı, **KKA:** Kongo Kırmızısı Agar, **MP:** Mikroplak

KKA yönteminin duyarlılık oranları *Listeria* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., ve *S. aureus* için sırasıyla %59, %13, %17 ve %97 olarak bulundu. Yöntemin gerçek pozitifleri ayırma düzeyi olarak ifade edilen özgüllük oranları ise *Listeria* spp., *E. coli* ve *Salmonella* spp. için sırasıyla %39, %89 ve %59 olarak tespit edildi. *S. aureus* izolatlarının tamamı (%100) MP yönteminde pozitif olarak belirlendiği için istatistiksel olarak özgüllüğü belirlenemedi. Cohen'in kappa katsayısına (κ) göre her iki yöntemin sonuçlarının uyumluluğu, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. için kötü ($\kappa < 0$), *E. coli* ve *S. aureus* için ise önemsiz olarak ($0.01 < \kappa < 0.2$) belirlendi (Tablo3).

4. Tartışma ve Sonuç

Patojenik mikroorganizmaların gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturmaları, gıda tesislerinde mikrobiyal kontaminasyon riskini artırarak insan sağlığını etkileyen çeşitli gıda güvenliği sorunlarına neden olmaktadır (1,26–28). Daha önce yapılan birçok çalışmada, çeşitli hayvansal gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. türlerinin biyofilm oluşturma özellikleri rapor edilmiştir (15–20). Bu çalışmada, gıda kaynaklı bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma

yetenekleri ve biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan KKA ve MP tekniklerinin etkinliği ve uyumu karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Analiz edilen *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria* spp., ve *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm pozitiflik oranı %11.4 ve %97.2 arasında değişkenlik gösterdi. Çalışmada duyarlılık açısından test edilen mikroorganizmaların biyofilm üretimini saptamada kullanılan her iki yöntemden elde edilen sonuçların benzer olduğu görüldü. Analiz edilen izolatların %51'inin KKA'da, %53'ü MP testinde biyofilm pozitif olarak belirlendi. Analiz edilen izolatların %34.8'i her iki testte biyofilm pozitif özellik gösterdi.

Test edilen *S. aureus* izolatlarının %35'i KKA'da, %36'sı MP'de ve %94.4'ü her iki yöntemde de biyofilm pozitif olarak tespit edildi. Benzer şekilde, Shakya ve ark. (36), sığır mastitisine sebep olan 20 MRSA izolatının, KKA'da %25 ve MP'de %45'inin biyofilm pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Jain ve Agarwal (37), biyofilm tespit yöntemlerini kıyasladıkları çalışmalarında analiz ettikleri 84 adet *S. aureus* izolatının %79'unun MP ile ve %75'inin KKA ile biyofilm pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Yine, Kırmusaoglu (22) analiz ettiği *S. aureus* izolatlarının %40'ının KKA'da pozitiflik gösterirken, %51'inin MP testinde pozitif sonuç gösterdiği bildirdi. Bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, daha önce yapılan birçok çalışma hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen *S. aureus* izolatlarının çeşitli derecelerde biyofilm yapma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (15,34,36-38). Kowalska ve ark. (39)'nın çalışma sonuçlarına benzer olarak, analiz edilen izolatların %58.3'ünün güçlü biyofilm yapma yeteneğine sahipti Buna karşın Uyanık ve ark. (34), Chen ve ark. (40) ve Güngör ve ark. (41) *S. aureus* izolatlarının genellikle zayıf biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *Listeria* spp. izolatlarının %94.1'ü zayıf biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti ve KKA, MP ve her iki testte izolatların biyofilm pozitiflik oranları sırasıyla %60, %56 ve %33.3 olarak tespit edildi. Daha önce yapılan birçok çalışmada da mezba ve gıda kaynaklı *Listeria* spp. izolatlarının biyofilm özelliklerinin belirlenmesinde MP yöntemi kullanılmış olup, orta ve zayıf düzeyde biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir (34,39,47,48). Davarpanah ve Bialvaei (49) analiz ettikleri 23 *L. monocytogenes* izolatının %86.95 ve %91.3'ünün sırasıyla KKA ve MP yöntemlerinde biyofilm pozitif olduğunu göstermişlerdir.

E. coli izolatlarının çoğunluğu (%62.5) daha önceki çalışma sonuçları (17, 34, 39, 50, 51) ile uyumlu olarak zayıf biyofilm üreticisi olarak tespit edildi. Analiz teknikleri kıyaslandığında, *E. coli* izolatlarının 4 (%11.4)'ü, 8 (%22.8)'i ve biri (%2.9) sırasıyla KKA, MP ve her iki yöntemde biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Benzer şekilde Onmaz ve ark., (52) balıktan elde ettikleri *E. coli*

izolatlarının %24'ünün KKA'da ve %36'sının MP testinde biyofilm pozitif olduğunu bildirmiştir. Kanatlı etinden izole edilen *E. coli* izolatlarının değerlendirildiği bir çalışmada ise pozitiflik oranının KKA'da %72, MP'de ise %94 olduğu tespit edilmiştir (53). Jain ve Agarwal., (37) bu çalışmadan farklı olarak, analiz ettikleri 30 *E. coli* izolatının biyofilm oluşturma yeteneğini belirlemede KKA yönteminde %90 ve MP yönteminde %70 biyofilm pozitiflik rapor etmişlerdir. *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, Amrutha ve ark. (56), Aksoy (57) ve Cufaoglu ve ark. (58) analiz ettikleri *Salmonella* izolatlarının güçlü biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada da izolatların %54.5'i güçlü ve %45.5'i orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edildi. Açıklık (59) ile Uyanık ve ark. (34) ise bu çalışma sonuçlarının aksine, analiz ettikleri kanatlı etlerinden izole ettikleri *Salmonella* izolatlarının biyofilm negatif olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, analiz edilen *Salmonella* spp. izolatların %35.2 ve %32'sinin sırasıyla KKA ve MP testinde biyofilm pozitif olduğu ve 9 (%26.5) izolatın her iki testte de uyumlu sonuç verdiği belirlendi. Aksoy (57) analiz ettiği 20 *Salmonella* izolatının %94 ve %100'ünün sırasıyla KKA'da ve MP de biyofilm pozitif olarak tespit etmiştir. Amrutha ve ark. (56) ise gıda kaynaklı *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm pozitiflik oranının KKA için %50'sinin MP testi için ise %75 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışma sonuçları MP yöntemine kıyasla KKA yönteminin *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin saptanmasında yüksek duyarlılıkta (%97) olmasına karşın, *Listeria* spp. izolatlarında iyi duyarlılık (%59) ve düşük özgüllüğe (%39) sahip olduğunu gösterdi (Tablo 3). Bu veriler *S. aureus*' un biyofilm yeteneğinin belirlenmesinde KKA'nın güvenilir bir yöntem olduğunu fakat, *Listeria* spp.'ler için bu yöntemin tek başına kullanılmasının yanlış pozitiflik veya yanlış negatifliğe neden olabileceğini göstermektedir (42). Bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde, daha önce yapılan bazı çalışmalarda, *S. aureus*'ların biyofilm yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerden KKA'nın duyarlılığının yüksek olduğu rapor edilirken (37,38); bazıları ise bu yöntemin duyarlılığının düşük olduğu ve güvenilir olmadığı öne sürülmüştür (42-45). Melo ve ark. (38) test ettikleri *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesinde KKA yönteminin duyarlılığını %86 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar KKA'nın *S. aureus*'un biyofilm özelliğinin tespit etmesinde istatistiksel olarak önem arz ettiğini; ancak, MP yönteminin duyarlılık açısından daha hassas olduğunu bildirmişlerdir (36). Dhanawade ve ark. (46)'da moleküler analizlerle MP ve KKA yöntemlerinin arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Tablo 3. Kongo kırmızısı agar yönteminin duyarlılık ve özgüllük oranları

Kriter	<i>Listeria spp.</i> (%95 GA)	<i>E. coli</i> (%95 GA)	<i>Salmonella spp.</i> (%95 GA)	<i>S. aureus</i> (%95 GA)
Duyarlılık*	0.59 (0.33-0.82)	0.13 (0.01-0.53)	0.17 (0.02-0.48)	0.97 (0.85-0.99)
Özgüllük**	0.39 (0.14-0.68)	0.89 (0.71-0.98)	0.59 (0.36-0.79)	-
Cohen'in Kappa katsayısı (κ)***	-0.03 (-0.38-0.33)	0.02 (-0.30-0.33)	-0.25 (-0.54-0.05)	0.00
Pearson Ki-Kare	X ² =0.02 p=0.880	X ² =0.01 p=0.914	X ² =1.12 p=0.289	-

GA: Güven aralığı, *Gerçek negatif olanları ayırma düzeyi, ** Gerçek pozitif olanları ayırma düzeyi, ***İki yöntem arasındaki uyumun belirlenmesinde κ değeri; <0'dan kötü, 0.01 ile 0.20 arası önemsiz, 0.21 ile 0.40 arası zayıf, 0.41 ile 0.60 arası orta, 0.61 ile 0.80 arası iyi, 0.81 ile 1.00 arası çok iyi düzeyde

Gram negatif bakteriler için bu iki yöntem karşılaştırıldığında; KKA yönteminde duyarlılıklar düşük olmasına rağmen özgüllüklerinin iyi olduğu belirlendi. Duyarlılık oranları *E. coli* ve *Salmonella spp.* izolatları için sırasıyla %13 ve %17, özgüllükleri ise %89 ve %59 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara benzer bir şekilde Hassan ve ark. (21) yaptıkları çalışmada KKA'nın *E. coli* izolatlarının biyofilm özelliklerini değerlendirmesinde duyarlılığını %11 ve özgüllüğünü ise %92 olarak bildirdi. Benzer bir şekilde Fazel ve ark (54) *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında KKA sonuçlarının duyarlılıklarını %50 ve özgüllüğünü ise %71 olarak belirledi. Bu çalışma ve daha önce yapılan çalışma sonuçları, KKA'nın *E. coli* ve *Salmonella spp.* izolatlarının biyofilm özelliğini tespit etmesinde gerçek negatifleri ayırma düzeyinde zayıf, gerçek pozitifleri ayırmada ise iyi olduğunu gösterdi (21,55). Bu bulgular, KKA yönteminin duyarlılığının düşük olması nedeni ile *E. coli* ve *Salmonella spp.* türlerinde tek başına kullanılması durumunda sonuçların yanlış değerlendirilmesine neden olabileceği sonucuna varıldı. Fakat özgüllüklerinin iyi olması, bu yöntemin MP yöntemini tamamlayıcı bir test olarak kullanılmasının uygun olacağını göstermektedir (36).

Sanchez Jr ve ark. (55)'in bildirdiği gibi, bu çalışmada belirlenen biyofilm oluşumunun hem bakteri türlerine hem de izolatlar (suş ve/veya serotip) bağlı olduğunu gösterdi. Analiz edilen izolatlardan her iki yöntemde de biyofilm üretme kabiliyeti en fazla *S. aureus*'larda en az ise *E. coli*'lerde tespit edildi. Bu durum analiz edilen *E. coli* izolatlarının büyük çoğunluğunda flagella antijen ve flagella ile ilişkili genin (fliCH7) bulunmadığını düşündürdü. Verstraeten ve ark. (60) ve Vazquez-Sanchez ve ark. (61), biyofilm oluşumu ve patogenezinin zorunlu olarak bakterilerin hareketliliklerini sergilemelerini gerektirdiğini göstermiştir. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneği çevresel faktör (bakterilerin yüzeye tutunmasında sıcaklık ve pH'nın etkisi vb.) ve bakterinin kendisine bağlı (yüzey yükü, hidrofilité, yüzey enerjisi ve organeller vb.) olduğu bildirilmiştir (58, 62, 63).

Çalışmada, izolatların çoğunluğunun biyofilm oluşturma yeteneklerinin pozitiflik dağılımının MP yöntemine kıyasla KKA testlerinde farklılık göstermesi, KKA besiyerinde koloni morfolojisinin kromojenik değerlendirmeye dayanması; dolayısı ile kalitatif ve subjektif olması ile ilişkilendirilebilir (64).

Sonuç olarak, bu çalışmada mezbaha ve mandıra orjinli gıda kaynaklı patojen bakterilerden *E. coli*, *Listeria spp.* *S. aureus* ve *Salmonella spp.* izolatlarının farklı derecelerde biyofilm yapma kabiliyetine sahip olduğu belirlendi. Biyofilm üretme yeteneği, bakterilerin işletme ortamda uzun süreli kalıcılığını etkileyen önemli bir faktördür ve ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasının yansısı teknolojik süreçlerde aksamalara neden olarak ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu nedenle gıda endüstrisinde bulunabilecek patojenlerin insan sağlığına yönelik riskleri azaltmak için biyofilm üretme potansiyelinin araştırılması önemlidir. Bu çalışmada KKA yönteminin MP'ye kıyasla *S. aureus* haricindeki diğer bakterilerde düşük duyarlılık fakat daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu; bu nedenle, MP yönteminin de tamamlayıcı bir test olarak KKA yöntemi ile kullanılmasının bulguların güvenilirliğini artıracığı sonucuna varıldı.

Kaynaklar

- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 2010; 8:623–33. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. International Journal of Environmental Research and Public Health 2021; 18: 1–31. doi:10.3390/IJERPH18042014.
- Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. Frontiers in Microbiology 2021; 12, 1106. doi: 10.3389/FMICB.2021.676458/BIBTEX.
- Kartal MO, Ekinci MB, Poyraz B. Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi. Akademik Gıda 2021; 19, 353-63. doi: 10.24323/akademik-gida.1011231.
- Gupta P, Gupta H, Poluri KM. Geraniol eradicates Candida glabrata biofilm by targeting multiple cellular pathways. Applied Microbial and Cell Physiology 2021; 105, 5589-605. doi: 10.1007/s00253-021-11397-6.

6. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 2019;5: e02192. doi: 10.1016/J.HELIYON.2019.E02192.
7. Abebe GM. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *Int J Microbiol* 2020;2020. doi: 10.1155/2020/1705814.
8. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, et al. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance* 2019; 25:72–9. doi: 10.1089/MDR.2018.0027.
9. Myszka K, Czaczyk K. Bacterial biofilms on food contact surfaces - a review. *Pol J Food Nutr Sci* 2011; 61. doi: 10.2478/v10222-011-0018-4.
10. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in Implant Infections: Its Production and Regulation 2018;28:1062–8. doi: 10.1177/039139880502801103.
11. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
12. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol* 2017;83. doi: 10.1128/AEM.02508-16
13. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endop Topics* 2010; 22:2–16. doi: 10.1111/J.1601-1546.2012.00277.X.
14. Olanbiwoninu AA, Popoola BM. Biofilms and their impact on the food industry. *Saudi J Biol Sci* 2023;30. doi: 10.1016/J.SJBS.2022.103523.
15. Achek R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Didouh N, et al. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. *Pathogens* 2020; 9:153. doi: 10.3390/PATHOGENS9020153.
16. Agostinho Davanzo EF, Dos Santos RL, Castro VH de L, Palma JM, Pribul BR, Dallago BSL, et al. Molecular characterization of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains from biofilms in cattle and poultry slaughterhouses located in the federal District and State of Goiás, Brazil. *PLoS One* 2021;16:e0259687. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0259687.
17. Bhardwaj DK, Taneja NK, DP S, Chakotiya A, Patel P, Taneja P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming, antimicrobial resistant, pathogenic *Escherichia coli* isolated from Indian dairy and meat products. *Int J Food Microbiol* 2021; 336:108899. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108899.
18. Ćwiek K, Korzekwa K, Tabiś A, Bania J, Bugla-Płoskońska G, Wieliczko A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. *Pathogens* 2020; 9:643. doi: 10.3390/PATHOGENS9080643.
19. Kaptchouang Tchatchouang CD, Fri J, Montso PK, Amagliani G, Schiavano GF, Manganyi MC, et al. Evidence of Virulent Multi-Drug Resistant and Biofilm-Forming *Listeria* Species Isolated from Various Sources in South Africa. *Pathogens* 2022; 11:843. doi: 10.3390/PATHOGENS11080843/S1.
20. Ma Y, Xu X, Gao Y, Zhan Z, Xu C, Qu X, et al. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* isolated from human patients and animal source foods in China. *Int J Food Microbiol* 2020; 335:108859. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108859.
21. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15:305–11. doi: 10.1590/S1413-86702011000400002.
22. Kırmusaoğlu S. The comparison of methods used for the detection of biofilm formation that cause antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2017; 9:28–33. doi: 10.21601/ORTADOGUTIPDERGISI.299940.
23. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 2018; 9:522–54. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
24. Ertaş N, Gönülalan Z. Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg* 2010; 24: 11–15.
25. Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenaillon O, Denamur E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology* 2008; 10: 1000–1006. doi: 10.1111/J.1462-2920.2007.01520.X.
26. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 1992; 6(4): 271–279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-F.
27. Al S, Disli HB, Hizlisoy H, Ertas Onmaz N, Yildirim Y, Gonulalan Z. Prevalence, and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from wastewater of cattle slaughterhouses in Turkey. *Journal of Applied Microbiology* 2022; 132(2): 1518–1525. doi: 10.1111/JAM.15261.
28. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872. doi: 10.1136/JCP.42.8.872.
29. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40:175–9. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.
30. Öcal D, Tekeli A, Dolapçı İ. Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumunun Çeşitli Kongo Kırmızısı Besiyerlerinde Değerlendirimi. *Temel Tıp Bilimleri* 2022; 75(1): 8-15. doi: 10.4274/atfm.galenos.2021.54366.
31. Agresti A. *An Introduction to Categorical Data Analysis*. Second Edition. Wiley-Interscience, 2007.
32. Kraemer HC. *Evaluating medical tests: Objective and quantitative guidelines*. Newbury Park, California: Sage publications Inc, 1992.
33. Alvarez-Ordóñez A, Coughlan LM, Briandet R, Cotter PD. Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities 2019;10:173–95. doi: 10.1146/ANNUREV-FOOD-032818-121805.
34. Uyanık T, Bölükbaş A, Gücükoğlu A, Çadircı Ö. Çeşitli gıda örnekleri ve kesimhanelerden izole edilen bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques* 2022; 7:338–45. doi: 10.31797/VETBIO.1194207.
35. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol* 2009; 20:407–13. doi: 10.1016/J.TIFS.2009.01.054.
36. Shakya P, Nayak A, Jogi J, Rai A, Bordoloi S, Scholar HK, et al. Phenotypic detection and comparison of biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *The Pharma Innovation Journal* 2022:1352–7.
37. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 2009; 76:88–92. doi: 10.1016/J.MMET.2008.09.017.

38. Melo P de C, Menezes Ferreira L, Nader Filho A, Francisco Zafalon L, Godoy Vicente HI, de Souza V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013; 44:119. doi: 10.1590/S1517-83822013005000031.
39. Kowalska J, Maćkiw E, Stasiak M, Kucharek K, Postupolski J. Biofilm-Forming Ability of Pathogenic Bacteria Isolated from Retail Food in Poland. *J Food Prot* 2020; 83:2032–40. doi: 10.4315/JFP-20-135.
40. Chen GQ, Wu YH, Wang YH, Chen Z, Tong X, Bai Y, et al. Effects of microbial inactivation approaches on quantity and properties of extracellular polymeric substances in the process of wastewater treatment and reclamation: A review. *J Hazard Mater* 2021; 413:125283. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125283.
41. Gungor C, Barel M, Dishan A, Burak Disli H, Koskeroglu K, Onmaz NE. From cattle to pastirma: Contamination source of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the pastirma production chain. *LWT* 2021; 151:112130. doi: 10.1016/J.LWT.2021.112130.
42. Knobloch JKM, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191:101–6. doi: 10.1007/S00430-002-0124-3/METRICS.
43. Sharlee R. Detection of biofilm production among *Staphylococcus aureus* by Congo red method and tube method. *Indian Journal of Microbiology Research* 2020; 7:222–5. doi: 10.18231/J.IJMR.2020.040.
44. Tahaei SAS, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D, Gajdác M. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: A laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infect Drug Resist* 2021; 14:1155–68. doi: 10.2147/IDR.S303992.
45. Ebineshan K, Pallapati MS, Srikantam A. Occurrence of bacterial biofilm in leprosy plantar ulcers. *Lepr Rev* 2020; 91:130–8. doi: 10.47276/LR.91.2.130.
46. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure N V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 2010; 34:81–9. doi: 10.1007/S11259-009-9326-0.
47. Moretro T, Langsrud S, Heir E. Bacteria on Meat Abattoir Process Surfaces after Sanitation: Characterisation of Survival Properties of *Listeria monocytogenes* and the Commensal Bacterial Flora. *Adv Microbiol* 2013; 2013:255–64. doi: 10.4236/AM.2013.33037.
48. Doijad SP, Barbuddhe SB, Garg S, Poharkar K V., Kalorey DR, Kurkure N V., et al. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS One* 2015;10: e0137046. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0137046.
49. Davarpanah M, Bialvaei AZ. Prevalence, antimicrobial resistance, and biofilm-formation of *Listeria monocytogenes* in bulk raw milk in East Azerbaijan province, Iran. *Reviews and Research in Medical Microbiology* 2023; 2023:73–8. doi: 10.1097/MRM.0000000000000313.
50. Flament-Simon SC, Duprilot M, Mayer N, García V, Alonso MP, Blanco J, et al. Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2019; 10:1183. doi: 10.3389/FMICB.2019.01183/BIBTEX.
51. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5:1–8. doi: 10.1186/S13756-016-0109-4/TABLES/5.
52. Onmaz NE, Yildirim Y, Karadal F, Hizlisoy H, Al S, Gungor C, et al. *Escherichia coli* O157 in fish: Prevalence, antimicrobial resistance, biofilm formation capacity, and molecular characterization. *LWT* 2020; 133:109940. doi: 10.1016/J.LWT.2020.109940.
53. Dishan A, Hizlisoy H, Barel M, Disli HB, Gungor C, Ertas Onmaz N, et al. Biofilm formation, antibiotic resistance and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail chicken meats. *British Poultry Science* 2022. doi: 10.1080/00071668.2022.2116697.
54. Fazel A, Bavari S, Borji S. Detecting of biofilm formation in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*: an evaluation of different screening methods. *Journal of Current Biomedical Reports* 2021;2. doi: 10.52547/JCBioR.2.2.56.
55. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; 13:47. doi: 10.1186/1471-2334-13-47.
56. Amrutha B, Sundar K, Shetty PH. Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables. *J Food Sci Technol* 2017; 54:1091–7. doi: 10.1007/S13197-017-2555-2/FIGURES/4.
57. Aksoy D. Determination of in vitro Biofilm Formation Abilities of Food Borne *Salmonella Enterica* Isolates. *Trak Univ J Nat Sci* 2019; 20:57–62. doi: 10.23902/TRKJNAT.471236.
58. Çufoğlu G, Onaran Acar B, Cengiz G, Ayaz ND, Göncüoğlu M. Mono-and Mixed-Species Biofilm Formation by *Salmonella* *Infantis*, *Salmonella* *Kentucky*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. *Mol Psychiatry* 2021; 47:149–53. doi: 10.5152/actavet.2021.21006.
59. Açıkalın D. *Salmonella* *Infantis* Suşlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Çevresel ve Genetik Faktörlerin Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.
60. Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* 2008; 16:496–506. doi: 10.1016/J.TIM.2008.07.004.
61. Vázquez-Sánchez D, Antunes Galvão J, Oetterer M. Contamination sources, biofilm-forming ability and biocide resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 isolated from tilapia-processing facilities. *J Food Saf* 2018;38: e12446. doi: 10.1111/JFS.12446.
62. Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Estève M, Ghigo JM, et al. Preventing Biofilm Formation and Associated Occlusion by Biomimetic Glycocalyxlike Polymer in Central Venous Catheters. *J Infect Dis* 2014; 210:1347–56. doi: 10.1093/INFDIS/JIU249.
63. Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 2017; 7:36670–83. doi: 10.1039/C7RA02497E.
64. Öcal DN, Dolapçı I, Karahan ZC, Tekeli A. Investigation of biofilm formation properties of *Staphylococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51:10–9. doi: 10.5578/MB.46552.