

Malik Asit Uygulamalarının *S.aureus* Biyofilmleri Üzerinde Antibiyofilm Etkileri*

Tuğba KÖKÜMER, Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Gebze/Kocaeli

Geliş (Received): 18.01.2015

Kabul (Accepted): 23.02.2016

ÖZET: Bu çalışmada, malik asit uygulamalarının *S. aureus* biyofilmleri üzerindeki antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Biyofilmlerin malik asit uygulamaları ile azalma oranları, klor uygulaması ile karşılaştırılmıştır. Malik asit ve klor uygulamalarının biyofilmler üzerindeki etkileri hem polistren hemde çelik yüzeylerde incelenmiştir. Malik asit uygulamaları, *S. aureus* biyofilmlerini klor uygulamasından daha etkin bir şekilde engellenmiş ve ortadan kaldırmıştır. Çelik yüzeylerde biyofilmlerin azalma oranlarının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, malik asitin gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşumları için ümit verici çevreyle dost bir uygulama olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Biofilm, malik asit, *S. aureus*, gıda ile temas eden yüzeyler

Antibiofilm Effects of Malic Acid Treatments on *S. Aureus* Biofilms

ABSTRACT: In this study, antibiofilm activities of malic acid treatments on *S. aureus* biofilms were investigated. The reduction ratios of biofilms by malic acid treatments were compared with chlorine treatment. The effects of sanitizers on biofilms were evaluated on both on polystyrene and stainless steel surfaces. Malic acid treatment more efficiently inhibited and removed *S. aureus* biofilms than chlorine treatment. The higher reduction ratios were obtained on stainless steel surfaces. The results show that malic acid could be a potential promising eco-friendly treatment for biofilm formations in food contact surfaces.

Key Words: Biofilm, malic acid, *S. aureus*, food contact surfaces

GİRİŞ

Staphylococcus aureus suşları insan ve hayvanlar için çok sayıda enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır. *S. aureus* suşları, insanların ve sıcakkanlı vücutlarının çeşitli bölgelerinde doğal olarak bulunurlar. *S. aureus* suşlarına özellikle gıdalarda ve gıda üretimindeki personel ile hastane personelinde de yaygın biçimde rastlanmaktadır (Rashid ve ark., 2012). Bu patojen mikroorganizma, insanlarda başta deri ve yumuşak doku olmak üzere çeşitli ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır (Mertz ve ark., 2007; van Belkum ve ark., 2009).

S. aureus, çiğ süt ve ürünlerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Özellikle mastitis hastalığı görülen hayvanlardan elde edilen sütlerin, patojenik *S. aureus* ile kontamine olma olasılıkları çok yüksektir (Scherrer ve ark., 2004; Peles ve ark., 2007; Günaydın ve ark., 2011). Süt ürünleri arasında sıklıkla peynirlerden kaynaklanan *Staphylococcus* zehirlenmeleri görülmektedir. Bunun nedeninin, *S. aureus*'un peynir yapım sürecinde gelişerek ürettiği enterotoksinler olduğu bilinmektedir (Durlu-Özkaya ve Cömert, 2008; Zinke ve ark., 2012).

Biyofilm, mikroorganizmaların yüzeye yapışarak ürettikleri ekzopolisakkarit matrisine gömülü halde, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş olarak oluşturdukları yaşam şeklidir (Flemming ve Wingender, 2010). Biyofilm tabakası, bakterileri antimikrobiyal maddelere karşı koruyan ve özellikle gıda sanayinde sorun yaratan önemli bir oluşumdur (Srey ve ark., 2013). Bunun en önemli sebebi, biyofilm içerisinde

bulunan bakterilerin antimikrobiyallere serbest yaşayan formlarına göre çok daha fazla dirençli olmalarındandır (Cos ve ark., 2010; Simoes, 2011).

Özellikle gıda işleme endüstrisindeki farklı yüzeyler bakterilerin tutunması ve biyofilm oluşturmaları için oldukça elverişli ortamlardır. Birçok mikroorganizma gıda işleme sanayinde paslanmaz çelik, cam ve teflon gibi yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilmektedir. Bu patojen bakterilerin biyofilmleri, üretilen gıdaların kontaminasyonuna neden olabilmektedir (Syne ve ark., 2013; Corcoran ve ark., 2014; Di Ciccio ve ark., 2015).

Stafilokokların, çeşitli yüzeylere yapışabilme ve biyofilm oluşturabilme özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Stafilokokların biyofilm oluşturmalarında *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit intersellüler adhesin (PIA) en önemli rolü üstlendiği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Arciola ve ark., 2015).

Süt endüstrisinde sanitasyon işlemleri her üretim periyodundan sonra yapılmaktadır. Bu nedenle üretilen sütün güvenliğini ve kalitesini arttırmak ancak doğal, ucuz, kalıntı bırakmayan sanitasyon uygulamaları ile mümkün olmaktadır. Günümüzde sıklıkla kullanılan başta klorlu bileşikler ve oksitleyici dezenfektanlar ürün kalitesi bozulmalarına, ekipmanlara, ve çevre ve insan sağlığına olumsuz etkilere yol açmaktadır (Knowless ve ark., 2015). Ayrıca dezenfektan kalıntılarının yoğurt ve peynir starter kültürleri için de inhibe edici etkileri olduğu bilinmektedir (Karagözlü ve Karagözlü, 2004).

Günümüzde tüketicilerin sağlıklı ve doğal ürünlere olan ilgisinin artması nedeni ile yeni ve doğal

*Yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Sorumlu yazar: Akbaş Yeşilçimen, M., akbasm@gtu.edu.tr

antimikrobiyallere ihtiyaç giderek artmaktadır (Xu ve ark., 2014). Bunlar arasında organik asitler doğal alternatifler arasında yer almaktadır. Organik asitler arasında malik asit birçok gıdada bulunan bir organik asittir. Malik asit uygulamasının *Listeria monocytogenes*, *Escherichia O157:H7* gibi birçok patojen üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu bulunmuştur (Raybaudi-Massilia, 2009). Yapılan çalışmalarda malik, sitrik, laktik ve tartarik asitlerin antibakteriyel etkileri olduğu belirlenmiştir (Eswaranandam ve ark., 2004; Lu ve ark., 2011). González -Fandos ve Herera (2013) %1 ve %2 konsantrasyonda 5 dakika süre ile malik asit uygulamasını tavuk etleri üzerinde *Listeria monocytogenes* üzerinde denemiler ve %2 malik asit uygulamasının inhibitör etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada %2 malik asitin 2ppm ozon ile birlikte kullanımının gıda temaslı plastik ve PVC (polivinil karbon) yüzeylerde *Salmonella Typhimurium*'un oluşturduğu biyofilmlerin kontrolü için etkili olduğu rapor edilmiştir (Singla ve ark., 2014). Özellikle mikrotitrasyon plağındaki biyofilm oluşumunda bu uygulama ile 6 kat azalma görülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda, bugüne kadar malik asit uygulamasının, gıda temaslı yüzeylerde, süt endüstrisinde önemli bir patojen olan *S. aureus* biyofilmlerinin kontrolü için uygulanmasına dayanan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, çiğ süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının oluşturduğu biyofilm oluşumunun, doğal bir antibiyofilm ajanı olarak malik asit (10%) ile engellenmesi ve oluşan biyofilmlerin ortadan kaldırılmasının endüstride sıklıkla kullanılan klor uygulaması (200 ppm) ile karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Suşlar ve Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada, çiğ sütlerden izole edilen 20 adet, vankomisine dirençli, biyofilm pozitif *S. aureus* suşu kullanılmıştır (Akbas ve Kokumer, 2015).

Biyofilm oluşumu, önlenmesi ve ortadan kaldırılması için kullanılacak olan bakteri kültürleri, *S. aureus* suşlarının katı Nutrient agar üzerinde üreyen bir-iki kolonisinin %2 (w/v) glukoz içeren TSB (Triptik Soy Broth) besiyerine (TSBG) inokülasyonu ve 37°C sıcaklıkta bir gecelik inkübasyonu ile elde edilmiştir. Daha sonra bu kültürler ayrı ayrı TSBG besiyeri ile McFarland değeri 0.5'e eşit (yaklaşık 10^8 kob/ml) olacak şekilde sulandırılarak biyofilm oluşumunda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Biyofilm Oluşumunun Polistren Yüzeylerde Önlenmesi

Steril 96 kuyulu polistren mikrotitrasyon plağı kuyularına 200µl %10 (w/v) konsantrasyonlarda malik asit veya süt işletmelerinde dezenfektan olarak sıklıkla kullanılan 200 ppm (v/v) konsantrasyonda klor

solüsyonu ilave edilerek 20 dakika süre ile bekletilmiştir. Uygulama sonrasında kuyular içerisindeki solüsyonlar pipet yardımı ile uzaklaştırılmış, mikrotitrasyon plakları oda sıcaklığında ters çevrilerek 30 dakika süre ile kurutulmuştur.

Biyofilm oluşumu için hazırlanan *S. aureus* suşlarının kültürlerinden, malik asit veya klor uygulanan mikrotitrasyon plağının her bir kuyusuna 1:200 oranında TSBG besiyeri ile birlikte eklenerek 37°C sıcaklıkta 48saat süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra, kuyulardaki sıvı besiyeri bir pipet ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kuyular distile su ile 3 kez yıkanarak oda sıcaklığında 30 dakika süre ile kurutulmuştur. Kuyulardaki biyofilm tabakası, %0.5 (v/v) konsantrasyonda 200µl kristal viyole solüsyonu ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek boyanmıştır. Boya pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra, boyanın çözünmesi için kuyulara, 200µl,%33 glasiyal asitik asit ilave edilerek 10 dakika süre ile bekletilmiştir. Her kuyudan 150µl alınarak yeni bir mikrotitrasyon plağına aktarılmıştır. Her kuyunun absorbans değeri 570nm'de bir mikrotitrasyon plağı okuyucusu (BMG Labtech Fluostar Omega ELISA, Almanya) yardımı ile belirlenmiştir. Her suş, her bir uygulama için iki farklı kuyuda, en az 3 tekrarlı şekilde denenmiştir. Sonuçlar, sadece besiyerini içeren (negatif kontrol) ve bakteri suşu inoküle edilen (pozitif kontrol, herhangi bir uygulanma yapılmayan) kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Stephanovic ve ark., 2000).

Biyofilm Oluşumunun Polistren Yüzeylerde Ortadan Kaldırılması

Biyofilm oluşumu için hazırlanan *S. aureus* suşlarının kültürlerinin her biri 1:200 oranında TSBG besiyeri ile birlikte polistren mikrotitrasyon plağı kuyularına eklenerek 37°C sıcaklıkta 48saat süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra, kuyulardaki sıvı besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyular distile suyla yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Oluşan biyofilmler malik asit (10%) veya klor (200 ppm) solüsyonları ile 20 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiş, daha sonra pipetle uzaklaştırılarak, yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması kuyuların %0.5(v/v) kristal viyole ile boyaması, boyanın glasiyal asetik asit ile çözüldürülmesi ve 570nm'de ölçülen absorbans değerleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar, sadece besi yerini içeren (negatif kontrol) vebakteri kültürü inoküle edilen (pozitif kontrol, herhangi bir uygulama yapılmayan) kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Biyofilm Oluşumunun Çelik Yüzeylerde Önlenmesi

Biyofilm oluşumu için, otoklavda steril edilen paslanmaz çelik kuponlar (20x40x1 mm) 50ml malik asit (%10) veya klor (200 ppm) solüsyonlarını içeren 100ml hacimli steril kavanozlar içerisine daldırılmıştır. Çelik kuponlar, daha sonra oda sıcaklığında 30 dakika

süre ile kurutulularak 50ml TSBG besi yeri içeren 10ml hacimli steril kavanozlar içerisine yerleştirilmiştir. Kavanozlar içerisindeki besi yerleri, hazırlanan bakteri kültürleri ile 1:200 oranında ayrı ayrı inoküle edilerek 37°C sıcaklıkta 48saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra çelik kuponlar %0.5 (v/v) kristal viyole içeren steril kavanozlar içerisinde 15 dakika süre ile boyanmıştır. Biyofilm oluşumuna bağlanan boya 50ml 33% glasiyal asitik asit içerisinde çözündürülmüştür. Her kavanozdan 200µl çözünmüş boya alınarak bir mikrotitrasyon plağına aktarılmıştır. Biyofilm oluşumu ve önlenmesi oranları kuyuların absorbans değeri 570nm’de ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar, sadece besi yerini içeren (negatif kontrol) ve bakteri kültürü inoküle edilen (pozitif kontrol, herhangi bir uygulama yapılmayan) kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Biyofilm Oluşumunun Çelik Yüzeylerde Ortadan Kaldırılması

Oluşan biyofilmlerin ortadan kaldırılması için otoklavda steril edilen paslanmaz çelik kuponlar, 50ml TSBG besi yeri içeren 100ml hacimli steril kavanozlar içerisine yerleştirilmiştir. Kavanozlar hazırlanan bakteri kültürleri ile 1:200 oranında ayrı ayrı inoküle edilerek 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kuponlar yıkanarak kurutulmuştur. Çelik kuponlar 50ml malik asit (%10) veya klor (200 ppm) solüsyonlarını içeren 100ml hacimli steril kavanozlar içerisine daldırılarak 20 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çelik kuponlar yıkanarak kurutulduktan sonra 50 ml %0.5 (v/v) kristal viyole içeren 100ml hacimli steril kavanozlarda boyanmıştır. Biyofilm oluşumuna bağlanan boya 50 ml 33% glasiyal asitik asit içerisinde çözündürülmüş ve her kavanozdan 200µl alınarak bir mikrotitrasyon plağına aktarılmıştır. Biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması oranları kuyulardaki çözünmüş boyanın absorbans değeri 570 nm’de ölçülmesiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, sadece besiyerini içeren (negatif kontrol) ve bakteri kültürü inoküle (pozitif kontrol, herhangi bir uygulama yapılmayan) kuyulardaki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Biyofilm oluşumlarının engellenmesi ve ortadan kaldırılmasındaki azalma oranları, malik asit veya klor uygulanmayan biyofilm oluşumlarına göre belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu, absorbans değeri (OD 570) > 0.1 durumlarda pozitif ve < 0.1 durumlarda negatif olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için, varyans analizi (anova) SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) programı ile yapılmış ve post hoc Tukey’s testi uygulanmıştır. $P < 0.05$ seviyesinde bulunan denemelerin sonuçları istatistiksel açıdan “önemli” olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Polistren Yüzeylerde Klor Uygulamaları

20 adet çiğ süt izolatu *S. aureus* suşunun klor (200 ppm) uygulaması ile mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelenmiştir.

Polistren yüzeylerdeki biyofilm oluşumunda ölçülen absorbans değerleri, çelik yüzeylerdekinden yüksek bulunmuştur.

Biyofilm oluşumlarının 200 ppm klor uygulaması ile bir suşta %51 ($P < 0.05$) oranında azaldığı, on suşta ise yaklaşık %20-%30 ($P < 0.05$) oranında önlendiği belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumlarının klor (200 ppm) uygulaması ile polistren yüzeylerde önlenmesi (A) ve ortadan kaldırılması (B) oranları (%)*

Suş	A	B
1	15 (0.03)	0 (0.00)
2	24 (0.01)	22 (0.00)
3	2 (0.03)	40 (0.05)
4	20 (0.05)	0 (0.08)
5	26 (0.02)	10 (0.00)
6	6 (0.05)	11 (0.08)
7	4 (0.01)	0 (0.00)
8	28 (0.00)	0 (0.01)
9	0 (0.00)	0 (0.00)
10	0 (0.08)	0 (0.00)
11	22 (0.00)	40 (0.05)
12	0 (0.00)	0 (0.00)
13	27 (0.02)	57 (0.06)
14	22 (0.00)	40 (0.00)
15	19 (0.02)	44 (0.00)
16	16 (0.03)	26 (0.00)
17	15 (0.02)	29 (0.00)
18	22 (0.00)	6 (0.00)
19	51 (0.00)	0 (0.00)
20	29 (0.05)	51 (0.00)

*Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir

Biyofilm tabakasının ortadan kaldırılması için, 200 ppm konsantrasyonunda klor uygulaması ile, oluşan biyofilmlerin, altı suşta yaklaşık %40-%60 ($P < 0.05$) oranında, üç suşta ise yaklaşık %20-%30 ($P < 0.05$) oranında azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çelik Yüzeylerde Klor Uygulamaları

Biyofilm oluşumunun, 200 ppm klor uygulaması ile bir suşta %35 ($P < 0.05$) oranında azaldığı, iki suşta ise yaklaşık %20-%30 ($P < 0.05$) oranında azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 2).

Biyofilmlerin, 200 ppm klor uygulaması ile 20 adet *S. Aureus* suşu arasından en fazla iki suşta yaklaşık %45 ($P < 0.05$) oranında, dokuz suşta ise yaklaşık %20-%40 ($P < 0.05$) oranında ortadan kaldırıldığı (%) belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. *S.aureus* suşlarının biyofilm oluşumlarının klor uygulaması ile paslanmaz çelik yüzeylerde önlenmesi (A) ve ortadan kaldırılması (B) oranları (%)*

Suş	A	B
1	0 (0.02)	45 (0.02)
2	22 (0.02)	0 (0.01)
3	35 (0.02)	29 (0.00)
4	0 (0.02)	0 (0.02)
5	0 (0.00)	20 (0.03)
6	0 (0.00)	31 (0.01)
7	12 (0.06)	17 (0.02)
8	0 (0.04)	20 (0.04)
9	6 (0.01)	40 (0.00)
10	0 (0.12)	0 (0.07)
11	0 (0.05)	9 (0.02)
12	0 (0.01)	40 (0.00)
13	0 (0.00)	23 (0.05)
14	0 (0.02)	2 (0.00)
15	0 (0.03)	40 (0.00)
16	0 (0.03)	32 (0.00)
17	0 (0.03)	0 (0.04)
18	16 (0.00)	11 (0.02)
19	29 (0.02)	46 (0.00)
20	15 (0.00)	0 (0.00)

*Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir

Polistren Yüzeylerde Malik Asit Uygulamaları

20 adet çiğ süt izolatu *S. aureus* suşunun malik asit (%10, w/v) uygulaması ile mikrotitirasyon plağında biyofilm oluşumunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelenmiştir. Biyofilm oluşumlarının %10 (w/v) malik asit uygulaması ile bir suşta yaklaşık %47 (P<0.05) ve altı suşta yaklaşık %20-%40 (P<0.05) oranında engellendiği tespit edilmiştir (Çizelge 3). Oluşan biyofilmlerin ise, %10 (w/v) malik asit uygulaması ile ise sekiz suşta yaklaşık %70-%85 (P<0.05) oranında, beş suşta yaklaşık %50-%65 (P<0.05) oranında ve yedi suşta ise %30-%45 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. *S.aureus* suşlarının biyofilm oluşumlarının malik asit uygulaması (%10) ile polistren yüzeylerde önlenmesi (A) ve ortadan kaldırılması (B) oranları (%)

Suş	A	B
1	4 (0.00)	43 (0.00)
2	47 (0.00)	76 (0.00)
3	20 (0.07)	85 (0.00)
4	24 (0.04)	69 (0.00)
5	24 (0.00)	77 (0.00)
6	13 (0.02)	76 (0.01)
7	38 (0.00)	38 (0.02)
8	11 (0.02)	40 (0.02)
9	1 (0.00)	37 (0.00)
10	0 (0.1)	76 (0.01)
11	0 (0.06)	60 (0.02)
12	0 (0.03)	34 (0.01)
13	0 (0.00)	85 (0.03)
14	0 (0.00)	53 (0.00)
15	0 (0.04)	36 (0.07)
16	30 (0.00)	64 (0.01)
17	20 (0.00)	62 (0.01)
18	6 (0.00)	56 (0.01)
19	8 (0.00)	45 (0.00)
20	0 (0.03)	83 (0.00)

*Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir

Çizelge 4. *S.aureus* suşlarının biyofilm oluşumlarının malik asit uygulaması (%10) ile çelik yüzeylerde önlenmesi (A) ve ortadan kaldırılması (B) oranları (%)*

Suş	A	B
1	0 (0.09)	83 (0.00)
2	0 (0.19)	83 (0.00)
3	0 (0.11)	79 (0.01)
4	0 (0.2)	79 (0.00)
5	66 (0.07)	83 (0.00)
6	30 (0.3)	73 (0.01)
7	0 (0.04)	85 (0.00)
8	0 (0.08)	82 (0.00)
9	0 (0.00)	82 (0.00)
10	8 (0.05)	81 (0.00)
11	79 (0.02)	95 (0.00)
12	15 (0.06)	95 (0.00)
13	67 (0.02)	90 (0.01)
14	20 (0.02)	60 (0.00)
15	0 (0.03)	84 (0.00)
16	0 (0.07)	90 (0.00)
17	20 (0.1)	59 (0.02)
18	14 (0.07)	73 (0.00)
19	0 (0.00)	90 (0.02)
20	21 (0.15)	90 (0.00)

*Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir

Çelik Yüzeylerde Malik Asit Uygulamaları

20 adet çiğ süt izolatu *S. aureus* suşunun malik asit (%10, w/v) uygulaması ile paslanmaz çelik kuponlarda biyofilm oluşumunun engellenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması oranları (%) incelenmiştir. Malik asit uygulaması (%10, w/v) ile ise biyofilm oluşumlarının üç suşta yaklaşık %65-%80 (P<0.05) oranında ve dört suşta yaklaşık %15-%20 (P<0.05) oranında önlenildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4). Oluşan biyofilmlerin ise, altı suşta yaklaşık %90-%95 (P<0.05), on iki suşta yaklaşık %70-%85 (P<0.05), iki suşta ise yaklaşık %60 (P<0.05) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4).

TARTIŞMA

Patojen bakterilerin oluşturdukları biyofilmler, endüstride önemli ekonomik kayıplara ve sağlık problemlerine yol açmaktadır. Sanayide sıklıkla kullanılan paslanmaz çelik, teflon ve polipropilen gibi yüzeyleri patojenik mikroorganizmalar kolaylıkla kontamine edebilmekte ve kolaylıkla biyofilm oluşturabilmektedir. Günümüzde endüstride, yüzey sanitasyonu için kullanılan yaygın dezenfektanlar arasında perasetik asit, ozon ve klor yer almaktadır. Ancak mikroorganizmalar özellikle biyofilm oluşturduklarında zamanla kullanılan bu dezenfektanlara direnç kazanırlar (Mah ve T'ooole, 2001).

Bu çalışmada, 200 ppm klor uygulaması ile biyofilm oluşumunun polistren yüzeylerde en fazla %51 oranında önlenildiği, oluşan biyofilmin de en fazla %57 oranında ortadan kaldırıldığı görülmüştür. Paslanmaz çelik yüzeylerde ise, 200 ppm klor uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %35 oranında önlenildiği, oluşan biyofilmin de en fazla %46 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir.

Polistren yüzeylerde, kullanılan%10 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %47 oranında önlediği, oluşan biyofilmin de en fazla %85 oranında ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Paslanmaz çelik yüzeylerde, %10 (w/v) malik asit uygulaması ile biyofilm oluşumunun en fazla %79 oranında önlediği, oluşan biyofilmin de en fazla %95 oranında ortadan kaldırdığı belirlenmiştir.

Çalışmada, malik asit uygulaması, *S. aureus* biyofilmlerini klor uygulamasından daha etkin bir şekilde engellemiş ve ortadan kaldırmıştır. Kullanılan malik asit ve klorun, biyofilm oluşumunu ve oluşan biyofilmi uzaklaştırmadaki etkinliklerindeki fark antimikrobiyal aktivitelerinin farklı olmasından ileri gelmektedir. Klor, hücrelerin zarında bulunan lipid-protein yapıya etki ederek toksik klorlu bileşikler oluşturur ve hücreden makromoleküllerin kaybına neden olur (Haas ve Engelbrecht, 1980). Organik asitler ise birçok bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip bulunmuştur (Eswaranandam ve ark., 2004; Akbas ve Ölmez, 2007). Organik asitlerin hücre membranından geçerek hücre sitoplazmasını asidifiye ettiği, hücrenin sitoplazmasının iç pH değerini dengelemek için protonları hücre dışına pompaladığı ve bu sırada enerji kaybettiği belirtilmiştir. Ayrıca organik asitlerin hücre zarına zarar verdiği ve DNA'yı denatüre ettiği bildirilmiştir (Lou ve Yousef, 1999; Ricke 2003).

S. aureus biyofilmlerinin hem klor hem de malik asit uygulamaları ile ortadan kaldırılma oranları, biyofilmlerin önlenme oranlarından daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, çelik yüzeylerde biyofilm oluşumunun yüksek oranlarda (>%80) uzaklaştırılabildiği suş sayısı ve azalma oranları polistren yüzeylere göre çok daha yüksek bulunmuştur. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarında biyofilm oluşturan yapıların hidrofobik karakterde oluşu önemlidir. Yüze yapışarak biyofilm oluşturabilme, aynı zamanda bir bakterinin sahip olduğu yüzey yapılarının karakteristiği ile de ilgili olabilir (Corpe, 1980; Williams ve Fletcher, 1996). Önceki çalışmalarda mikroorganizmaların hidrofobik özellikteki polistren yüzeylere paslanmaz çelik gibi hidrofobik yüzeylerden daha hızlı yapışabildikleri rapor edilmiştir (Corpe, 1980; Williams ve Fletcher, 1996; Marques ve ark., 2007). Bu çalışmada da, *S. Aureus* suşları polistren yüzeylere daha hızlı yapışmış ve daha dayanıklı biyofilmler oluşturmuş olabilir. Bu nedenle çelik yüzey gibi hidrofobik karakterdeki yüzey materyallerinin gıda ile temas eden yüzeylerde kullanımı doğru bir yaklaşım olacaktır.

SONUÇ

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, *S. aureus* suşlarının biyofilmleri üzerinde malik asitin antibiyofilm özelliği incelenmemiştir. Özellikle gıda sanayinde biyofilmlerin oluşumunun önlenmesi ve oluşan biyofilmin azaltılması daha sonraki kontaminasyonlar ile alet ve ekipmanın korozyonunun önlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada uygulanan doğal antibiyofilm ajanı olarak malik asitin daha farklı konsantrasyon ve sürelerle de uygulanabilirliğinin ve bu uygulamaların büyük ölçekte

optimize edilerek sanayide kullanılabilirliğinin araştırılması gerekmektedir.

Bu nedenle, çalışmadan elde edilen sonuçlar, malik asit uygulamasının, *S. aureus* biyofilmlerinin kontrolünde, gıda sanayinde uygulanan klor gibi çevre ve canlılar için toksik etkileri olan kimyasallara alternatif olabileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gebze Teknik Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akbas, M.Y., Kokumer T., 2015. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7): 1666–1672.
- Akbas, M.Y., Olmez, H. 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 619-624.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., Montanaro, L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesion in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5:7. doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican M. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (4): 1507-1514.
- Corpe, WA. 1980. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: Bitton G, Marshall KC, editors. *Adsorption of microorganisms to surfaces*. New York: John Wiley and Sons; p. 105-144.
- Cos, P., Tote, K., Horemans, T., Maes, L. 2010. Biofilms an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 16: 2279-2295.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A.R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50: 930–936.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193.
- Durlu-Özkaya, F., Cömert, M. 2008. Gıda zehirlenmelerinde faktörler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(3):149-158.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, O157:H7, and *Salmonella* Gaminara. *Journal of Food Science*, 69: 79-84.
- Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623-633.

- González-Fandos, E., Herrera, B. 2013. Efficacy of malic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *Poultry Science*, 92(7):1936-1941.
- Günaydin, B., Aslantaş, Ö., Demir, C. 2011. Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, 43(8): 1633–1637.
- Haas C.N., Engelbrecht. R.S. 1980. Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 52:1976–1989.
- Karagözlü, C., Karagözlü, N. 2004. Süt endüstrisinde deterjan ve dezenfektan kalıntılarının önemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(3/4): 73-81
- Knowless, J.R., Roller, S., Murray, D.B., Naidu, A.S. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 797-803.
- Lou, Y. Yousef, A.E. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd Ed. (E.T. Ryser and E.H. Marth, eds.), 131–224, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Lu, Huiying J., Breidt, Jr., Frederick, Pérez-Díaz, Ilenys M., Osborne, Jason A. 2011. Antimicrobial effects of weak acids on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 under anaerobic conditions. *Journal of Food Protection*, 74(6):893-898.
- Mah, T.F.C., O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9: 34-39.
- Marques, S.C., Rezende, J.G.O.S., Alves, L.A.F., Silva, B.C, Alves, E., Abreu, L.R., Piccoli, R.H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 538-543.
- Mertz, D., Frei, R., Jaussi, B., Tietz, A., Stebler, C., Flückiger, U., Widmer, A.F. 2007. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease*, 45(4):475-457.
- Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, 118 (2): 186–193.
- Rashid, Z., Farzana, K., Sattar, A., Murtaza, G. 2012. Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and associated risk factors. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69 (5): 985-991.
- Raybaudi-Massilia, M.R., Melgar, J.M, Sobrino López, A. Martín-Belloso, A. 2009. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 and shelf life extension of fresh-cut pears using malic acid and quality stabilizing compounds. *Journal of Food Quality*, 32,(5): 539–565.
- Ricke, S.C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82: 632–639.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Stephan, R. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, 101: 101-107.
- Simoes, M. 2011. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 2129-2145.
- Singla, R., Goel, H., Ganguli, A. 2014. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 118(1):34-40.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2):572–585.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175–179.
- Syne, S., Ramsuhag, A. Adesiyun, A. 2013. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3. doi:<http://dx.doi.org/10.3402/iee.v3i0.20450>
- Van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., Wertheim, H.F. 2009. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *Journal of Infectious Disease*, 199(12):1820-1826.
- Williams, V., Fletcher, M. 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1004.
- Xu, C., Yagiz, Y., Hsu, W.Y., Simonne, A., Lu, J., Marshall, M.R. 2014. Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(28): 6640–6649.
- Zinke, C., Winter, M., Mohr, E., Krömker, V. 2012. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cheese produced in German farm-dairies. *Advances in Microbiology*, 2: 629-633.