



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ÇİĞ İNEK SÜTÜNDE LİZOZİM VE GÜMÜŞ ANOT
UYGULAMASININ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'NIN
BİYOFİLM OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
GÖZLEMLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sergül ÇİBİK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayhan DURAN

AKSARAY, 2023

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 202324001 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Sergül ÇİBİK tarafından hazırlanan “ÇİĞ İNEK SÜTÜNDE LİZOZİM VE GÜMÜŞ ANOT UYGULAMASININ *Pseudomonas aeruginosa*'NIN BİYOFİLM OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ayhan DURAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

Selçuk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Aysun YÜCETEPE

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 05 / 01 / 2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

İmza

Sergül ÇİBİK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım öncesinde ve devamında, benim nazarımda çok değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, gece gündüz demeden benimle beraber çalışmalarına eşlik ederek, çıkacak sonuçları merak ve heyecanla takip eden, benim göremediğim noktaları görerek adeta üçüncü gözüm olan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ayhan DURAN'a minnet ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Uzayıp giden deneme çalışmaları, yayım süreci ve tez çalışmalarım benden her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, sorumluluk alanımda olupta yetişemediğim ailevi işlerime büyük bir özveri ile yetişen, yorulup pes ettiğim zamanlarda “Çok emek verdin, yüzdün yüzdün kuyruğuna geldin, pes etmek, bırakmak yok...” diyerek benim itici gücüm olan çok kıymetli eşim İbrahim ÇİBİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Mühendislik eğitimi ve takip eden yüksek lisans sürecimde her defasında benimle gurur duyduklarını dile getiren, çalışmalarım ve yazım sürecim esnasında bana verdikleri desteklerden ötürü çocuklarım Tayfun, Aydan ve Kerem ÇİBİK'e teşekkürlerimi sunar, gelecekte daha üstün başarıları kendilerinde de görmeyi temenni ederim. Benden dualarını eksik etmeyen, “Yetiş annecim, sana çok ihtiyacım var!...” dediğim anda canını dişine katarak yardımına yetişen çok kıymetli anneciğim Zeynep KUMRU'ya sayısız minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın elektriksel düzenekleri ile ilgili ve diğer bilimsel kısımlarda benden her türlü teknik, mekanik ve bilimsel desteklerini esirgemeyen çok kıymetli hocalarım “Aksaray Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu” Öğr. Gör. Yasin BEKTAŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Mahir AKGÜN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Barış ÖZLÜ'ye sonsuz minnet ve teşekkürü bir borç bilirim. Gümüş plaklarıma saflık değerleri bozulmadan sap kalıplama ve kaynak işlerinde bana yardımcı olan "Gözgü Gümüş" işletme çalışanı Sayın Kerim TÜMER'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim ve çalışmalarım ve dahi mühendislik eğitimlerim boyunca, derslerime katılmam ve çalışmalarımı yerine getirmem için izne ihtiyaç duyduğum her anda, beni ve çabalarımı anlayışla karşılayarak benden desteklerini esirgemeyen çok değerli amirim “Aksaray Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu” sekreteri Nuran Şehnaz ÇETİN'e sonsuz minnet ve teşekkürü bir borç bilirim.

Ve bıkmadan, yorulmadan, büyük bir dayanıklılık, sabır ve azimle hedefimden ve yolumdan şaşmadığım için kendime çok teşekkür ederim.

Sergül ÇİBİK
AKSARAY, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Morfolojik Özellikleri.....	4
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın koloni morfolojisi	5
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın pigment özellikleri.....	7
1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın biyokimyasal özellikleri.....	9
1.3 Virülans Faktörleri	12
1.3.1 Bakterinin hücre yüzeyi ile ilişkili, yüzey virülans faktörleri	13
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tarafından hücre dışına salgılanan virülans faktörleri.....	14
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da "Quorum Sensing" Sistemi ve Biyofilm Oluşturması	15
1.4.1 "Quorum Sensing" sistemi	15
1.4.2 Biyofilm oluşumunun mikroorganizma açısından önemi	16
1.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın biyofilm oluşturma yeteneği.....	18
1.4.4 Biyofilm oluşum mekanizması	18
1.5 Biyofilmlerin Süt ve Diğer Sektörlerde Yol Açtığı Sorunlar	21
1.6 Lizozim ve Antibakteriyel Etki Mekanizması.....	24
1.7 Antibakteriyel Gümüş ve Gümüş Anot Tekniği	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
3. METARYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1 Mc Farland Standartlarının Hazırlanması	38
3.1.1 %1'lik H ₂ SO ₄ hazırlanması	39
3.1.2 %1.175'lik BaCl ₂ .2H ₂ O hazırlanması.....	39
3.1.3 0.5 no Mc Farland standardının hazırlanması.....	39
3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakterisine Karşı Lizozim İçin MIC Değerinin Belirlenmesi	39
3.3 Gümüş Anot Düzeneginin Oluşturulması	40
3.3.1 Gümüş plakaların hazırlanması	40
3.3.2 Gümüş anot düzenegi.....	41
3.3.3 Uygun akım ve sürenin belirlenmesi.....	43
3.4 Uygulama Desenleri.....	44
3.5 Mikrobiyolojik Analizler.....	45
3.6 Kimyasal Analizler.....	46
3.7 Biyofilm Analizi.....	46
3.7.2 %0.5'lik kristal viyole hazırlanması	47
3.7.3 %70'lik etil alkol hazırlanması	48
3.7.4 Biyofilm oluşumunun yorumlanması.....	48

3.8 Sütte Geçen Ag ⁺ Miktarının Tayini	49
3.9 İstatistiki Hesaplar	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	51
4.1 Kimyasal Analiz Sonuçları	51
4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Aktifleştirilmesi ve Doğrulama Testleri.....	51
4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın 0.5 Mc Farland Standardına Ayarlanması.....	52
4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakterisine Karşı Lizozim İçin MIC Değerinin Tespiti	54
4.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 İlaveli Çiğ Sütte Uygulanacak Olan Akım ve Sürenin Belirlenmesi	58
4.6 Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Tekniğinin Uygulanması.....	64
4.7 Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Uygulaması ile <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 'nın Biyofilmi Analizi Sonucu	67
4.8 Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Tekniğinin <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> 'ya Karşı Antibakteriyel Etki Sonucu	74
4.9 Çiğ Sütteki Ag ⁺ Miktarı Analiz Sonucu.....	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ.....	94

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞ İNEK SÜTÜNDE LİZOZİM VE GÜMÜŞ ANOT UYGULAMASININ *Pseudomonas aeruginosa*'nın BİYOFİLM OLUŞTURMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ

Sergül ÇİBİK

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayhan DURAN

ÖZET

Bu çalışmada, çiğ sütte Gümüş Anot Tekniği ve Lizozim enzimi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde meydana gelen antibiyofilm etkileri incelenmiştir. Ayrıca lizozim ve gümüş anot tekniğinin çiğ sütteki antibakteriyel etkileri 0, 24, 48 ve 72 saatlik depolama süreçlerinde gözlenmiş ve gümüş anot tekniğinin süt parametrelerine olan etkisi de tespit edilmiştir. Çalışmada, çiğ süütün doğal florasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu lizozim tek başına %47 oranında engellemiştir. Çiğ süte inoküle edilen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun biyofilm oluşturmada ise %40 oranında engellemiştir. Aynı koşullarda gümüş anot tekniğinin antibiyofilm etkisi süütün doğal florasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa* için %62, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu inoküle edilmiş çiğ süt için %58 olarak neticelenmiştir. En yüksek antibiyofilm etkisi lizozim ve gümüş anot tekniğinin bir arada sinerjist olarak kullanıldığı desenlerde görülmüştür. Doğal florasında *Pseudomonas aeruginosa* içeren çiğ sütte %75 oranında biyofilm engellenmişken, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 inoküle edilmiş çiğ sütte %78 biyofilm azalması görülmüştür. Lizozim, depolama süreçleri boyunca tek başına *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı bakteriyostatik etki göstermiştir. Gümüş anot tekniği ise ilk uygulandığı anda 1 log'a varan düşüş sağlarken, özellikle depolamanın 72. Saatinde 1.5-2 log arası bakteri azalması sağlamıştır. Çiğ sütte gümüş anot tekniği ve lizozim enziminin bir arada kullanılması ile uygulama anında 1 log'a varan bakteri azalması görülmüştür. Depolamanın 24 ve 48. saatlerinde azalma devam etmiş ve nihai olarak depolamanın 72. saatinde 2-2.5 log arası azalmayla sonuçlanan güçlü bakterisidal etki görülmüştür. Çalışmadan elde edilen sonuçlar süt sektöründe bu bakterinin atıkları ve biyofilmi ile mücadelede Lizozim ve Gümüş Anot Tekniğinin önemli role sahip olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Çiğ Süt, Gümüş Anot Tekniği, Lizozim, *Pseudomonas aeruginosa*.

Ocak, 2023; 94 sayfa

M.Sc. THESIS

OBSERVATION OF THE EFFECTS OF LYSOSYME AND SILVER ANODE APPLICATION IN RAW COW MILK ON BIOFILM FORMATION OF *Pseudomonas aeruginosa*

Sergül ÇİBİK

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Ayhan DURAN

ABSTRACT

In this study, antibiofilm effects on *Pseudomonas aeruginosa* were investigated by using Silver Anode Technique and Lysozyme enzyme in raw milk. In addition, the antibacterial effects of lysozyme and silver anode technique on raw milk were observed at 0, 24, 48 and 72 hours storage periods, and the effect of silver anode technique on milk parameters was determined. In the study, lysozyme inhibited biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*, which is found in the natural flora of raw milk, by 47%. It prevented the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strain inoculated into raw milk by 40%. Under the same conditions, the antibiofilm effect of the silver anode technique resulted in 62% for *Pseudomonas aeruginosa* found in the natural flora of milk and 58% for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 inoculated raw milk. The highest antibiofilm effect was seen in the designs where lysozyme and silver anode technique were used together as synergists. While 75% biofilm was prevented in raw milk containing *Pseudomonas aeruginosa* in its natural flora, 78% biofilm reduction was observed in raw milk inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Lysozyme alone showed bacteriostatic activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas aeruginosa* during storage periods. The silver anode technique, on the other hand, provided a decrease of up to 1 log at the first application, and a decrease of 1.5-2 logs of bacteria, especially at the 72nd hour of storage. With the combination of silver anode technique and lysozyme enzyme in raw milk, up to 1 log of bacteria reduction was observed at the time of application. The reduction continued at 24 and 48 hours of storage. A strong bactericidal effect was seen, ultimately resulting in a reduction of 2-2.5 logs at 72 hours of storage. The results obtained from the study showed that Lysozyme and Silver Anode Techniques may have an important role in the fight against the waste and biofilm of this bacterium in the dairy sector.

Keywords: Raw Milk, Silver Anode Technique, Lysozyme, *Pseudomonas aeruginosa*.

January, 2023; 94 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte bir ülserin klinik görünümü.	3
Şekil 1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın elektron mikroskopundaki görüntüsü	5
Şekil 1.3. Ksiloz Lizin Sodyum Deoksikolatagar plakasında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakteri kültürü. Ortası kabarık, yassı, yuvarlak ve beyaz renkli koloniler	6
Şekil 1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (American Type Culture Collection (ATCC) 27853) suşunun çizgi ekimde oluşturduğu hemoliz zonu	6
Şekil 1.5. Farklı besiyeri ortamlarında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın pigmentleri.	7
Şekil 1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile inoküle edilmiş tüp ve suda çözünen yeşil piyosyanin pigmenti oluşumu (sol tüp), bakteri inoküle edilmemiş kontrol tüpü (sağ tüp)	8
Şekil 1.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' da O/F testinde yeşil olan besiyeri renginin oksidasyonun ilerlemesine bağlı olarak zamanla renginin sarıya dönmesi. a; 24 saatlik inkübasyon sonucu, b; 48 saatlik inkübasyon sonucu, c; 5 günlük inkübasyon sonucu renkteki değişimler	10
Şekil 1.8. Ayıraç içeren swap mikroorganizma kolonisine dokundurulmuş ve renk değişimi ile oksidaz enzimi pozitif olarak yorumlanmıştır. A; oksidaz pozitif, B; oksidaz negatif.....	10
Şekil 1.9. Test tüpünde katalaz enziminin pozitif ve negatif tespitleri. Kabarcıklı tüp katalaz pozitif (solda), kabarcık olmayan tüp katalaz negatif (sağda) olarak yorumlanmaktadır	11
Şekil 1.10. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 suşunun M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki açık sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril Luria Bertani Broth (LBB).....	12
Şekil 1.11. Bakteriyel infeksiyonların ilk aşamalarında bakteri sayısı azdır ve QS sinyalizasyon sistemleri aktivite olmamaktadır. Artan bakteri sayısı ile beraber hareketlilik artmakta, QS sistemi devreye girmekte ve virülans faktörler salgılanarak biyofilm oluşumu başlamaktadır.....	16
Şekil 1.12. Farklı yüzeylerde biyofilm yapısı	17
Şekil 1.13. Biyofilm oluşum mekanizması.....	19
Şekil 1.14. Bakteri kamçısının genel yapısı.....	20
Şekil 3.1. 10 gr ve 5gr olarak temin edilen paketli saf gümüşler.....	40
Şekil 3.2. Gümüş plakaların saplarının kalıplanmış ve plakaya işlenmiş hali.....	40
Şekil 3.3. Gümüş anot plakalarının petri kabına yerleştirilmiş pozisyonu.	41
Şekil 3.4. 1.5 Volt' luk saat pili (solda), 5 MΩ' luk potansiyometre (sağda).....	42
Şekil 3.5. Mavi bant içine sabitlenmiş saat pili, potansiyometre, iletken kısıkaçlar ve gümüş plakalar düzeneği.	42
Şekil 3.6. Spektrofotometrik eliza test cihazı.	47
Şekil 4.1. TSB içinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 suşunun aktifleştirilmesi, solda inoküle tüp ve sağda şahit tüp.	52
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın 42 °C' de üremesi.	52
Şekil 4.3. Hazırlanan Mc Farland bulanıklık standartlarının densitometre ile doğrulanması.	53
Şekil 4.4. TSB' da aktifleştirilmiş <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın (en solda) ,10 ml % 0.9' luk NaCl içinde 0.5 no Mc Farland bulanıklık standardına	

ayarlanması (ortada). 0.5 Mc Farland ayarlaması yapılmış <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 suşu (en sağda).	54
Şekil 4.5. Lizozim konsantrasyonları.	55
Şekil 4.6. Kirby Bauer yöntemine göre disk difüzyon testinin uygulanışı.	56
Şekil 4.7. İnkübasyon sonunda oluşmayan inhibisyon zonları.	56
Şekil 4.8. Hazırlanan yeni lizozim konsantrasyonları.	57
Şekil 4.9. İnkübasyon sonunda oluşan zonlar ve kumpas ile çap ölçümleri.	57
Şekil 4.10. Steril cam petri kaplarına 40'ar ml çiğ sütün alınması.	59
Şekil 4.11. Plakaların alkolde bekletilip, bek alevinden geçirildikten sonra steril cam petri kabına alınıp, ağzı kapalı şekilde soğutulması.	60
Şekil 4.12. Potansiyometrenin, avometre kontrolünde, hesaplanan MΩ seviyesine ayarlanması.	61
Şekil 4.13. Ayarlaması yapılan gümüş anot düzeneğinin bek alevleri arasındaki platforma sabitlenmesi (üstte solda), çalışmanın yapılması (üstte sağda), desenler arası alkolde bekletilen gümüş plakalar (altta solda) ve alkolden alınan gümüş plakaların alevden geçirilerek sterilize edilmesi (altta sağda).	62
Şekil 4.14. Petri kaplarına CA besiyerinin dökülmesi (sağda), uygulama desenlerinin cam petri kaplarına yazılması (ortada), lizozim içeren desenlerin petri kaplarına lizozim enziminin tartılması (sağda).	65
Şekil 4.15. Steril mezürün ve çiğ sütün buzdolabından çıkarılması (solda), sütün hacimlendirilmesi (ortada), lizozim enzimini steril spatula ile karıştırılması (sağda).	65
Şekil 4.16. Gümüş anot uygulaması için pil gerilimi ölçümü (solda), potansiyometrenin direnç ayarının (ortada) yapılması ve teknik düzeneğin kurulması (sağda).	66
Şekil 4.17. İlgili petri kaplarına bakteri inokülasyonu (solda), K4 çalışma desenine gümüş anot uygulaması (soldan ikinci), K5 desenine gümüş anot uygulaması (soldan üçüncü) ve K6 desenine gümüş anot uygulaması (sağda).	66
Şekil 4.18. Biyofilm analizi için kuyucuklara TSB _G alınması ve Mikroplate'in inkübasyon için kurumayacak şekilde kapatılması.	68
Şekil 4.19. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan mikroplate kuyucuklarının biyofilm analizi için hazırlanması.	69
Şekil 4.20. Bakteriyolojik ekim için seri dilüsyonların hazırlanması (solda), vortexlenmesi (ortada) ve ekimin yapılması (sağda).	74
Şekil 4.21. Üst soldan sağa doğru K, K1, K2, K3 ve alt soldan sağa doğru K4, K5, K6 ve K7 kodlu çalışma desenlerinin başlangıç (1. saat) 10 ⁻¹ dilüsyonun koloni ekim sonuçları.	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Uygulama desenleri ve içerikleri.....	44
Çizelge 3.2. Biyofilm sonuçlarının yorumlanmasında faydalanılacak olan semi kantitatif skala.....	48
Çizelge 4.1. Çiğ sütün kimyasal parametre analiz sonuçları.....	51
Çizelge 4.2. Mc Farland standartlarının numarası ve %1'lik H ₂ SO ₄ ile %1,175'lik BaCl ₂ .2H ₂ O kullanım oranları.....	53
Çizelge 4.3. MIC testi sonucu ölçülen zon çapları (değerlere 6 mm lik disk çapı dahildir).....	58
Çizelge 4.4. Ekimler sonucunda elde edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> koloni sayıları (kob ml ⁻¹).....	63
Çizelge 4.5. L ₁₆ ortogonal tablosu.....	63
Çizelge 4.6. Çıktı parametreleri için S/N yanıt tablosu.....	64
Çizelge 4.7. 96 kuyucuklu mikropalakda biyofilm desenleri ve açıklamaları.....	67
Çizelge 4.8. Semi kantitatif skalaya göre biyofilm oluşumu değerlendirme aralıkları.....	69
Çizelge 4.9. Uygulama desenlerinin absorbans sonuçları ve biyofilm oluşumu karakteristikleri.....	70
Çizelge 4.10. Çalışma desenlerinin birbirleri arasında biyofilm azalması yönünden karşılaştırılması.....	71
Çizelge 4.11. Çiğ süt üzerinde lizozim enziminin ve gümüş anot tekniğinin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> üzerindeki antibakteriyel etkisine dair koloni sayıları.....	75
Çizelge 4.12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 inoküle edilmiş çiğ sütte, lizozim ve gümüş anot tekniğinin antibakteriyel etkisine dair koloni sayıları.....	76
Çizelge 4.13. 20 µA'de 1 dk. akım uygulanan sütteki Ag ⁺ miktarı.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AgNP	Gümüş Nanopartikül
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANOVA	Analysis Of Variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASUBTAM	Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi
ATCC	American Type Culture Collection
BaCl₂.2H₂O	Baryum Klorit
CA	Cetrimide Agar
Cdna	Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
CFTR	KistikFibrozisTransmembran Regülatör Proteini
CFU	Coloni Forming Unit
CO₂	Karbon Dioksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Eh	Redoks Potansiyeli
EMB	EosinMethylene Blue
EPA	ABD Çevre Koruma Kurumu
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda Ve Tarım Örgütü
GMP	Guanizin Mono Fosfat
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksid
H₂SO₄	Sülfirik Asit
HNO₃	Nitrik Asit
ICP-MS	İndüktif Olarak eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrofotometresi
kob	Koloni Oluşturan Birim
LBB	Luria Bertani Broth
log	Logaritmik Birim
LPS	Lipopolisakkarit
M	Mukoid
M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra
MHA	Mueller Hinton Agar
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NaCl	Sodyum Klorid
N_c	Koloni Sayısı
NH₃	Amonyak
no	Numara
NO₃	Nitrat
O/F	Oksidasyon/Fermentasyon
O₂	Oksijen
O₂⁻	Süperoksit Radikali
OD_{cut off}	Sınır Absorbans Değeri
OD_{ilk}	İlk Absorbans Değeri
OD_{ort}	Ortalama Absorbans Değeri

Od_{son}	Son Absorbans Değeri
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PET	Poli Etilen Tereftalat
pH	Power Of Hydrogen - Sıvı Ortamdaki Hidrojen Derişimi
ppb	Parts Per Billion (milyarda bir)
PVC	Poli Vinil Klorür
QS	QuorumSensing
R	Rough
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
S/N	Sinyal/Gürültü
SD	Standart Sapma
-SH	Tiol Grupları
SI	Uluslararası Birim Sistemi
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TKM	Toplam Kuru Madde
TS	Türk Standardı
TSB	Tryptic Soy Broth
TSBg	Glikozlu Tryptic Soy Broth
UHT	Ultra-High Temperature
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
%	Yüzde
±	Artı-Eksi
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
°C	Santigrat
µA	Mikroamper
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
IV	Roma Rakamında Dört
A	Amper
Ag	Gümüş
Ag⁺	İyonik Gümüş
atm	Atmosfer Basıncı
cm	Santimetre
cm²	Santimetrekare
dk	Dakika
Fe	Demir
Fe⁺²	Demir II, Ferrus
Fe⁺³	Demir III, Ferric
g	Gram
K	Kelvin
kg	Kilogram
kΩ	Kiloohm
L	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre

mm	Milimetre
MΩ	Mega ohm
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
U	Ünite
V	Volt
v/v	Hacim/Hacim
v/w	Hacim/ Kütle
vb	Ve Benzeri
vd	Ve Diğerleri
vs	Vesaire
w/v	Kütle/Hacim
y.y	Yüz Yıl
β	Beta
Ω	Ohm

1.GİRİŞ

Süt yapısında yağ, protein, vitaminler ve mineral maddeler bulunan sıvı, yüksek besleyicilik değerine sahip bir gıdadır. Besleyici değerinin yüksekliği ve her dişi canlının bünyesinde doğum ile kendiliğinden oluşabildiği için yaşama gözlerini açan her yavru bireyde ilk tüketilmeye başlanan, gelişmeyi, büyümeyi ve hastalıklara karşı bağışıklık kazanmayı sağlayan en temel besin ögesidir.

Sütün böylesine kompleks ve yüksek besin değerine sahip oluşu makro canlılar için biyoyarar sağlamakla kalmaz, mikro canlıların büyümesi ve gelişmesi için de uygun bir ortam hazırlar. Sütün canlılara yeterli ve etkili bir besin olabilmesi için bünyesindeki besinsel öğelerin yeterli miktarda ve olması gereken nitelikte bulunması, ayrıca mikro canlıların yararlı ve probiyotik nitelikte olanlarının yeteri kadar, patojen ve hastalık yapıcı olanlarının ise hiç bulunmaması veya yasaların izin verdiği asgari sınırlarda olması gerekmektedir.

Sağım anından önce, memedeki alveol lümenlerinde biriken sütün steril olduğu kabul edilir. Fakat oluşan süt meme kanalına girdiği andan itibaren meme kanalının ucunda bulunan bakteriler tarafından kontaminasyona uğramaktadır. Özellikle sağım hijyeni kurallarına uyulmadan yapılan sağımlarda çiğ sütün mikrobiyal yükü ziyadesiyle artmakta, ayrıca hayvandan hayvana geçen bulaşıcı hastalıklar ile mücadele etmek de zorlaşmaktadır (Alişarlı vd., 2003; Başar ve Heperkan, 2021).

Sütün sağımdan sonra hemen ısıt işlem görmemesi, soğuk depolama tanklarına alınması, sütün sağımının ahır ortamı gibi elverişsiz koşullarda yapılması, süt işleme alet ve ekipmanlarının yetersiz dezenfeksiyon işlemlerine maruz bırakılması gibi etkenlerden dolayı, işletmelerin hazırlık süreci boyunca ya da sütün nakliyesi esnasında geçen sürelerde mevcut bakteriler logaritmik olarak hızla artış göstermekte (Ergüllü ve Üçüncü, 1982) ve buda çiğ sütün ve dolayısı ile üretilecek olan ürünün kalitesini olumsuz etkilemektedir. Bakteriler çiğ sütte geliştikleri sürece atık olarak yüksek ısıt işlemlere bile dayanıklı lipolitik ve proteolitik enzimler oluşturmakta veya bu sütleri tüketen canlılarda toksikasyonlara, intoksikasyonlara ve dahi pek çok hastalığa neden olmaktadır (Alaşlar, 2020; Uraz ve Çıtak, 1998).

Çiğ sütün yapısında *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* gibi laktik asit bakterileri, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* ve koliform grubu bakterileri gibi gram negatif psikrofilik bakteriler bulunmaktadır. Bunların dışında *Bacillus* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif patojen bakteriler de sıklıkla bulunmaktadır (Başar ve Heperkan, 2021).

Çiğ sütü, bu bakterilerin faaliyetlerinden korumaya yönelik ilk ve en genel tedbir sütün soğutulmasıdır. Fakat soğutma işlemi sütte bulunan laktik asit bakterilerinin faaliyetini durdururken, psikrofilik bakterilerden özellikle *Pseudomonaslar*'ın çoğalmasına ve metabolik atıklarını üretmeye devam etmesine neden olmaktadır. Çiğ süt, sağımdan hemen sonra hızla soğutulmadığı takdirde laktik asit bakterilerinden homofermentatif olanlar laktozu parçalayıp laktik asit üretirken, heterofermentatif olanlar ise karbondioksit (CO₂), asetik asit gibi diğer yan ürünler üreterek sütün bozulmasına neden olmaktadır. *Pseudomonaslar* çoğu zaman ise soğuk zincir koşulları altında dahi ısıya dirençli lipazlar üreterek ısıl işlem görmüş sütte acımsı tat oluşturmaktadırlar. Bazen de ısıya dirençli proteazlar üretilip Ultra-High Temperature (UHT) sütlerde bile tatlı pıhtılaşma dediğimiz protein denatürasyonlarına sebep olmaktadır (Arslan vd., 2013). *Pseudomonas*'ları gıdalar için önemli kılan pek çok özellik vardır. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla gelişebilmeleri sonucu özellikle et ve et ürünleri gibi yüksek protein değerine sahip gıdaların yüzeye yakın bölgelerinde okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Psikrofil, mezofil veya psikrotrof türleri vardır.

Pseudomonas grubu bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa*, organik maddelerde ve sıvı ortamlarda uzun süre canlı kalabilmektedirler. *Pseudomonas aeruginosa* toprakda, su ve süt gibi sıvı ortamlarda ve genel olarak doğada yaygın olarak bulunmaktadır. İnsan ve memeli hayvan bağırsağında flora elemanı olarak bulunmaktadır. Özellikle sığırların yetiştirildiği yerlerde fazlaca bulunurlar. Dolayısı ile sağım alet ve ekipmanlarından, ıslak ahır ortamlarından ve hijyen kurallarına dikkat etmemiş personelden süte rahatlıkla kontamine olabilmektedirler (Şen ve Halkman, 2006).

Pseudomonas'lar sütün tazeliğini bozduğu gibi ayrıca süt tüketimi aracılığı ile de vücuda alınıp çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle fırsatçı patojen

olarak bilinen *Pseudomonas aeruginosa*'nın, sütün çok fazla tüketildiği 0-3 yaş grubu çocuklarda, kontamine kaplardan enfekte olarak solunum yollarına yerleştiği, hastalıklara ve salgınlara yol açtığı ifade edilmiştir (Ayhan, 2016). Hastane ortamları organik madde (kan, irin, idrar vs.) yönünden zengin olduğu için bu ortamlarda sık karşılaşmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* antibiyotik ve dezenfektanlara karşı da oldukça dirençli mikroorganizmadırlar. Bu yönüyle de canlılarda ciddi boyutlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedirler.

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa cerrahi yaralara yapılan pansuman ajanlarında mavi renk dönüşümüne neden olan bakteri (Şekil 1.1) olarak 1850'de Sedillot tarafından tanımlanmıştır. Bu bakteri *Bacillus pyocyaneus* ve *Pseudomonas pyocyanea* gibi farklı isimlerde de adlandırılmıştır. 1862'de Lucke tarafından *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgü piyosiyanın pigmentinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın saf kültür olarak izolasyonu 1882 yılında Gessard tarafından yapılmıştır. Ayrıca 1882'de, Carle Gessard "Bandajların mavi ve yeşil renklendirilmesi üzerine" adlı yayınladığı ilk bilimsel çalışma ile *Pseudomonas aeruginosa* 'nın karakteristik pigmentasyonundan bahsetmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, ultraviyole ışık altında floresan özellikte, mavi-yeşil, suda çözünebilen pigmentler üretmiştir ve bu pigmentlerin piyosiyanın olduğunu belirtmiştir (Şen ve Halkman, 2006; URL-1).



Şekil 1.1. *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte bir ülserin klinik görünümü (Tzika vd., 2015).

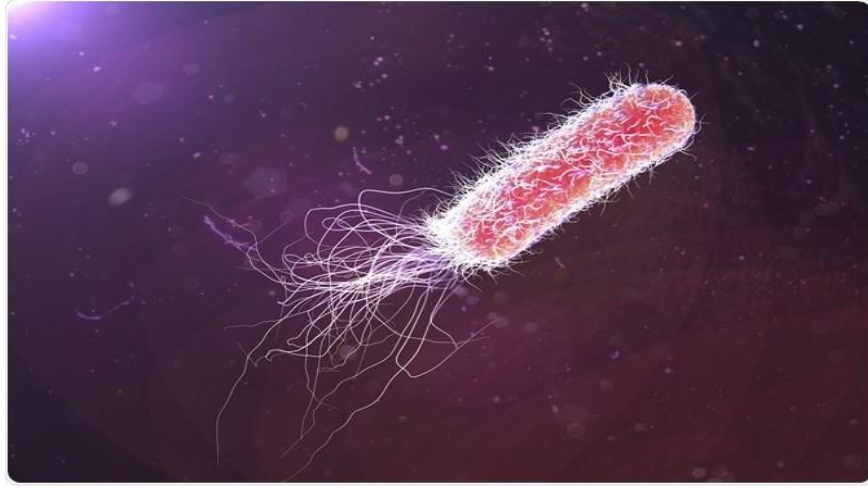
Daha sonraki yıllarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın patojen bir bakteri olduğu tanımlanmış ve *Pseudomonas* türlerinin, bazı organik bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına göre belirlenen sınıflandırmaları yapılmıştır. 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları, *Pseudomonas*'ları ribozomal ribo nükleik asit (r-RNA) benzerliklerine göre 5 grup olarak sınıflandırmış ve *Pseudomonas aeruginosa* 'yı r-RNA grup I olarak tanımlamışlardır (Şen ve Halkman, 2006).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Morfolojik Özellikleri

Pseudomonadaceae familyasına dahil olan *Pseudomonas*'ların doğada çok fazla türüne rastlandığı için bu mikroorganizmaları tanımlamada sınıflandırma yoluna gidilmiş; mikroorganizmanın görünümü, pigment oluşturup oluşturmadığı ve metabolik faaliyetleri gibi etkenler sınıflandırmalarda spesifik öneme sahip olmuştur.

Pseudomonas aeruginosa; 1,5-3 µm genişliğe sahip, sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde aerob bir bakteridir. *Pseudomonas* türleri (*Pseudomonas spp.*) sıvı ortamlarda rahatlıkla üreyebilen, zorunlu aerob mikroorganizmalardır. Fakat bu aileye mensup *Pseudomonas aeruginosa* solunum faaliyetlerinde nitrat (NO₃) kullanabilme özelliğinden dolayı yani solunumda son elektron alıcı görevini nitrat yaptığı için (nitrat solunumu) anaerobik olarak da yaşama kabiliyetine sahiptir. Bundan dolayı yüzeye yapışarak oluşturduğu, ekzopolisakkarit yapıdaki anaerob ortam olan biyofilm içinde rahatlıkla beslenir, çoğalır ve varlığını korur (Sırıken ve Öz, 2017).

Pseudomonas aeruginosa kutupsal uçlarında bir veya iki-üç adet flagellası (kirpik, kamçı) bulunan (Şekil 1.2) ve bu sayede özellikle sıvı ortamlarda çok kolay yüzüp, yer değiştiren hareketli bir mikroorganizmadır. Gram negatif oldukları için gram boyamada pembe-kırmızı renk verirler. Kültür ortamında uzun süre beklemiş olan ya da uzun süre pasajlara maruz kalmış suşlarda rough (R) tipinde üreyen, patojen etkisini kaybetmiş, antiseptik veya dezenfektan gibi tehdit unsurlarının bulunduğu ortamlarda deformasyona uğramış kısa veya çok uzun şekillerde, hareketsiz ve pigmentsiz özelliklerde, *Pseudomonas aeruginosa* 'ların da bulunduğu bildirilmiştir (Şen ve Halkman, 2006).



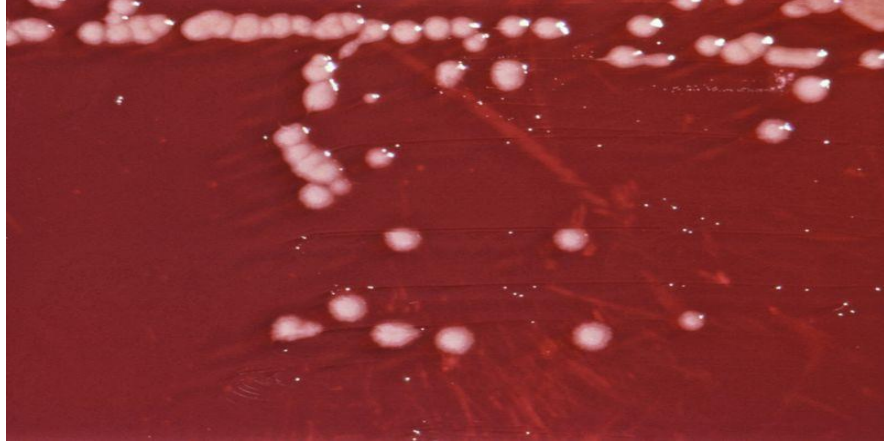
Şekil 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*’nın elektron mikroskobundaki görüntüsü (URL-2).

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*’nın koloni morfolojisi

Pseudomonas aeruginosa spesifik koloni yapısı, pigmentleri ve kültürlerinde oluşturduğu üzüksü kokusuyla kolaylıkla tanınabilmektedir. Üreyebildiği kültür ortamı yelpazesi geniş ve tanımlanmasını sağlayan spesifik özelliklere sahiptir. Bundan dolayı *Pseudomonas aeruginosa*’nın klinik mikrobiyoloji laboratuvarında identifikasyonu kolaydır. Fakat gram negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan standart kültür yöntemlerinin yanı sıra özgül şeker oksidasyon testi gibi bazı doğrulama testlerine de ihtiyaç olabilmektedir (Tuncer ve Akova, 1997).

Pseudomonas aeruginosa, katı besiyerlerinde 3 tip koloni oluşturmaktadır;

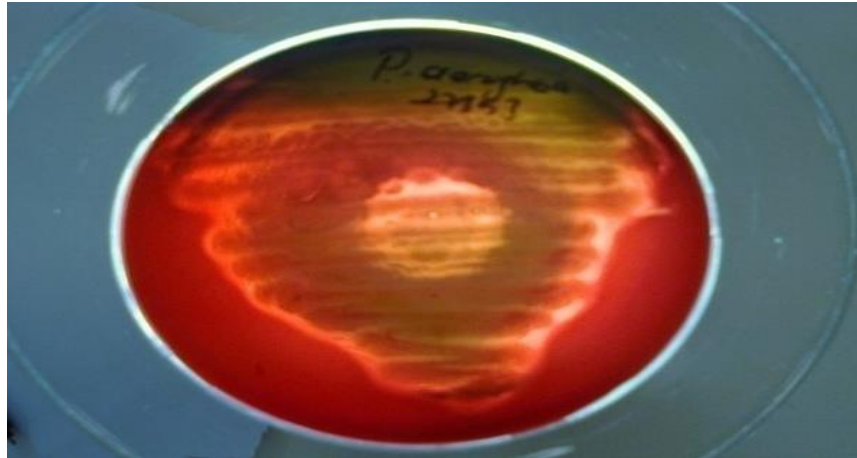
1. Tip koloni; hastane ortamından (kan, irin vs.) izole edilir. 2-3 mm çapındadır. Ortası kabarık, yassı ve yuvarlaktır (Şekil 1.3). Mat yüzeyli, beyaz renkli ve uygun besiyeri ortamında fluoresans özelliği ile yeşil-mavi pigmentleri göze çarpan kolonilerdir.
2. Tip koloni; Çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilir, daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz koliform kolonilerine benzeyen kolonilerdir.
3. Tip koloniler ise mukoid (M) tipi koloni dediğimiz, daha virülans olan *Pseudomonas aeruginosa*’nın ürettiği ve yine hastane ortamlarından izole edilen fakat bu sefer salgıladığı aljinat nedeni ile mukoid yapı ve görünüm oluşturan kolonilerdir.



Şekil 1.3. Ksiloz Lizin Sodyum Deoksikolatagar plakasında *Pseudomonas aeruginosa* bakteri kültürü. Ortası kabarık, yassı, yuvarlak ve beyaz renkli koloniler (URL-3).

Besiyerinde triptofan 2-aminoasetofenon üretir ve bundan dolayı *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgü karakteristik bir koku oluşmaktadır. Petri kutusunun kapağı açıldığında üzüm kokusu veya sabun kokusu şeklinde hissedilmektedir.

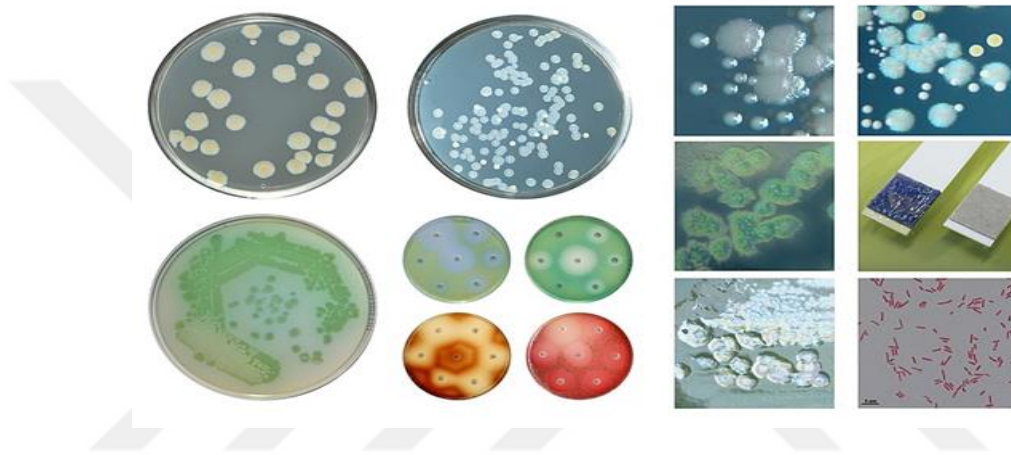
Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cama benzeyen, kenarları dalgalı ve düzensiz şekilde koloniler oluştururlar. Genellikle kanlı agarda beta hemoliz (eritrositlerin tam olarak eritilmesine bağlı olarak kolonilerinin etrafında şeffaf zonlar) oluştururlar (Şekil 1.4). Laktoz içeren besiyerinde üretildiklerinde, laktaz negatif oldukları için renksiz, şeffaf koloni yaparlar (Maçın, 2014).



Şekil 1.4. *Pseudomonas aeruginosa* (American Type Culture Collection (ATCC) 27853) suşunun çizgi ekimde oluşturduğu hemoliz zonu (Karakaş, 2013).

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın pigment özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, sıvı besiyeri olarak et ekstraktlarından elde edilen kültürlerde üretildiğinde sık ve düzenli yayılan bir üreme sergilerler. İlave olarak yüzeyde zar yapar ve zarın hemen altında mavi yeşil pigment oluştururlar. Eski ve alkali et ekstraktı kültürlerde bakteriler eritici fermentlerin etkisiyle erirler ve sıvı kültür ortamı berrak hale dönüşür. Agarda da floresans özelliği olan sarı-yeşil renkte veya besiyerinin her tarafına yayılmış bulunan yeşil-mavi renkte pigmentleri görülür (Şekil 1.5) (URL-4).



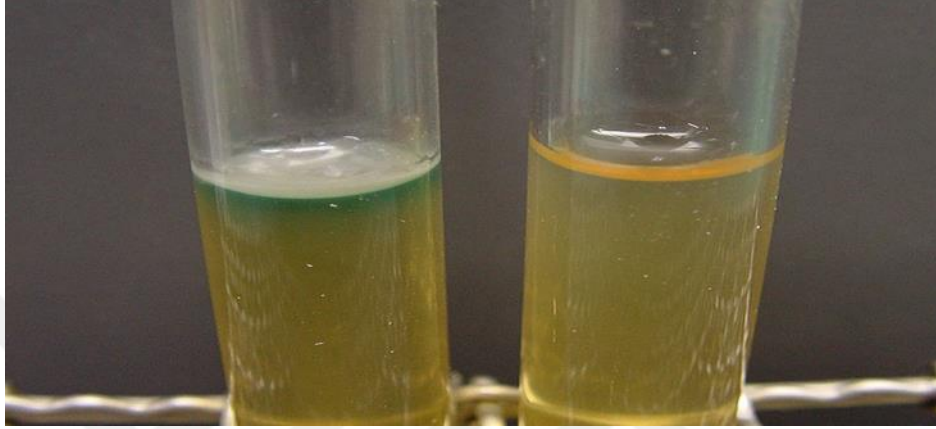
Şekil 1.5. Farklı besiyeri ortamlarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın pigmentleri (URL-5).

Aeruginosa teriminin Latince anlam karşılığı “bakır pası” dır. *Pseudomonas aeruginosa*’nın bu ismi almasındaki en büyük etken uygun besiyerlerinde tıpkı bakır pası renginde mavi-yeşil pigment üretmesidir.

Pseudomonas aeruginosa suşları temelde 2 çeşit pigment üretirler: Piyosiyenin pigmenti mavi renk oluşturur, piyoverdin (fluorescein) pigmenti ise sarı-yeşil renk oluşturur (Sırıken ve Öz, 2017).

Piyosiyenin; Aerob ortamda oluşur, mavi renkli bir fenazin türevidir, suda ve kloroformda erir, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından salgılanan spesifik bir pigmenttir. Asitlendirilmiş ortamda sarı-kırmızı, alkali ortamlarda ise renksiz karakter gösterebilir. Sıvı besiyerlerine kloroform eklenir ise kloroform besiyerinin dibine çöker ve beraberinde kristalize olmuş piyosiyenin pigmenti koyu mavi renkte gözlenir (Şekil 1.6). King A besiyeri piyosiyenin üretimini artırır dolayısı ile bu

ortamda 37 °C'de 5 günlük inkübasyon sonucunda, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının %80' i piyosiyanin oluşturur. Piyosiyanin pigmentinin antibiyotik özelliğinin bulunması *Pseudomonas aeruginosa* 'ya sağlanan en önemli avantajlardan birisidir. Bu bakteriyostatik etkiden dolayı *Pseudomonas aeruginosa* 'nın bulunduğu ortamlarda *Brucella*, *Shigella*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella*, *Vibrio* gibi mikroorganizmaların gelişimi baskılanır (Akoğlu, 2006; URL-4).



Şekil 1.6. *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edilmiş tüp ve suda çözünen yeşil piyosiyanin pigmenti oluşumu (sol tüp), bakteri inoküle edilmemiş kontrol tüpü (sağ tüp) (URL-5).

Piyoverdin; Piyosiyanin pigmentinin aksine sadece suda erir, kültürde meydana gelen sarı-yeşilimsi floresan rengin sorumlusudur (URL-4; URL-5).

Bunların dışında piyorubin ve piyomelanin pigmentleri de bulunmaktadır.

Piyorubin, parlak kırmızı rengin oluşmasından sorumlu pigmenttir. Kloroformda çözünmez ancak suda çözünürlüğü iyidir. Anaerob ortamlarda renk vermez.

Piyomelanin, besiyerinde kahverengi-siyah rengin oluşmasına sebep olan pigmenttir fakat bu renk oluşumu çok sık gözlenmez (Akoğlu, 2006).

Pigmentler aynı zamanda siderofor olarak görev yaparlar yani bakterinin metabolik olaylar ve gelişimi için ihtiyaç duyduğu demir III, ferric (Fe^{+3}) elementini kullanılabilmesi için demirin kompleks bileşiklerden demir II, ferrus (Fe^{+2}) olarak çözündürülmesini sağlarlar. Dolayısı ile demir (Fe) elementinin az olduğu ortamlarda siderofor olarak görevlendirilmek üzere pigment üretimi artar (Maçın, 2014).

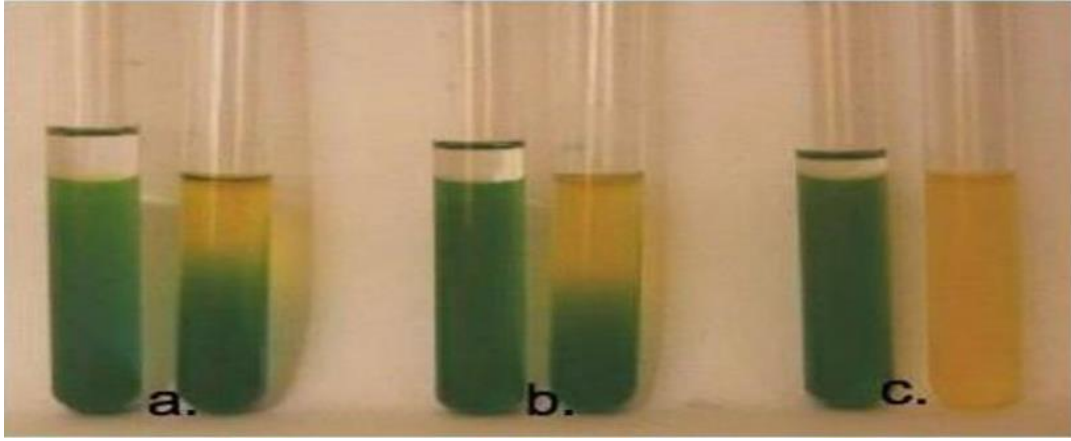
1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyokimyasal özellikleri

Zorunlu aerobtur, ancak oksijen yokluğunda da ortamda son elektron alıcı olarak NO_3 kullanabilmesinden dolayı yaşamını devam ettirir. Yani nitrat solunumu yapar ve bu sayede NO_3 'ı amonyak (NH_3)'a indirger. Organik üreme faktörlerine ihtiyacı yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. *Pseudomonas* türleri aminoasidi karbon ve nitrojen temini için kullanabilirler. Ortamda aminoasit varsa, hücre zarında bulunan ve madde geçişinden sorumlu proteinler olan permeazlar aktifleşir ve bu da aminoasitlerin hücre içine kolayca geçişini sağlar. Bakteri hücreleri aminoasiti herhangi bir değişikliğe uğratmadan direkt olarak kullanabilirler. Dolayısı ile bakteri gıda kaynağı olarak aminoasit kullandığı sürece hücre enerjisi güvencedir (Moore vd., 2005; Sırıken ve Öz, 2017).

Pseudomonaslar; mezofil, psikrofil veya psikotrof (Optimum 20-30 °C'de ve donma noktasının altında -10 °C'ye kadar) olarak farklı sıcaklıklarda gelişim gösterirler. 20-42 °C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilirler fakat en optimum üreme 37 °C'de gerçekleşir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın 42 °C'de de üreyebilme yeteneği onu diğer *Pseudomonaslar*'dan ayırmaktadır.

Pseudomonaslar'ın gelişim gösterebildikleri potansiyel hidrojen (pH) aralığı geniştir (pH=5.6-8.0 arası). Ancak en iyi gelişme pH'sı 6.6-7.0 aralığındadır. İzolasyonları kolay bakterilerdir. Bu durumun nedeni laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan besiyerlerinde dahi rahatlıkla üreyebilmeleridir (Maçın, 2014).

Pseudomonas aeruginosa karbonhidratları (laktoz ve sakaroz) fermente edemez fakat karbonhidratlardan özellikle glikozu oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluşturur. Bu yönüyle oksidasyon/fermentasyon (O/F) testinde, Hugh ve Leifson besiyerinde oksidatif karakterde glikozun ayrışması; aerob koşullarda, mavi-yeşil olan besiyeri renginin sarıya dönmesi ile gözlemlenir ve oksidasyon pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 1.7).



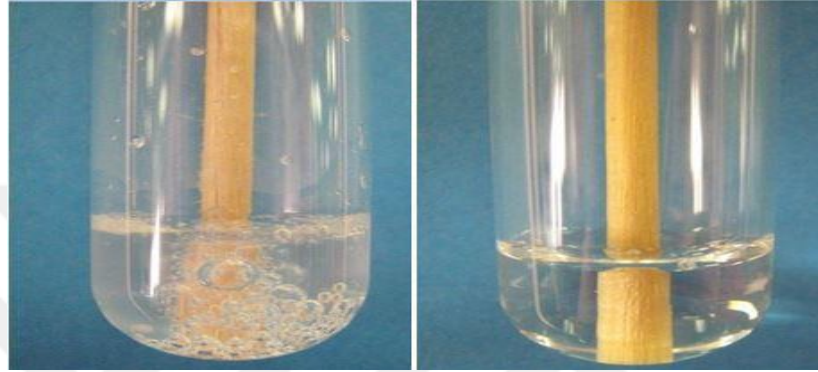
Şekil 1.7. *Pseudomonas aeruginosa*’ da O/F testinde yeşil olan besiyeri renginin oksidasyonun ilerlemesine bağlı olarak zamanla renginin sarıya dönmesi. a; 24 saatlik inkübasyon sonucu, b; 48 saatlik inkübasyon sonucu, c; 5 günlük inkübasyon sonucu renkteki değişimler (URL-6).

Pseudomonas aeruginosa oksidaz (sitokrom C oksidaze) pozitifdir. Bu enzim *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen hücre içi bir enzimdir. Bu enzim, fenilendiamin bileşiklerini okside ederek indofenole dönüştürür. Bu dönüşümün tespiti, oksidaz testinde 2-3 damla kadarlık oksidaz ayırıcı (%0,5 tetrametil-p-fenilendiamin) üzerine, öze ile şüpheli koloniden bir miktar alınarak sürüldüğünde veya swap yöntemine göre; ayıraca batırılan swap koloni üzerine değdirildiğinde kırmızı, mavi–mor renk oluşması ile yapıla bilinir (Şekil 1.8). Hiçbir renk değişimini oluşmaması oksidaz negatif olarak değerlendirilir. Koloniler siyah renk almışsa mikroorganizma kolonisi ölüdür.



Şekil 1.8. Ayıraç içeren swap mikroorganizma kolonisine dokundurulmuş ve renk değişimi ile oksidaz enzimi pozitif olarak yorumlanmıştır. A; oksidaz pozitif, B; oksidaz negatif (URL-7).

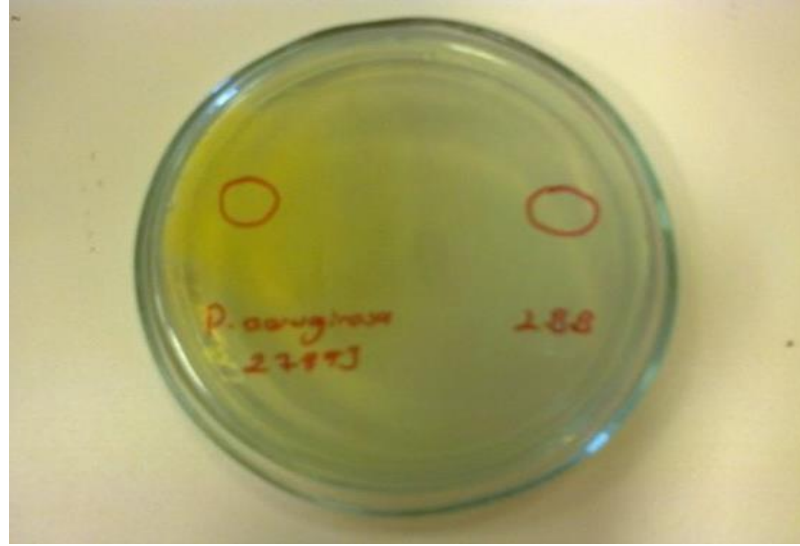
Pseudomonas aeruginosa, katalaz enzimi (hidrojen peroksit oksido redüktase) sentezlemektedir. Bu enzimin tayini (kanlı agar hariç) katı besiyerinde üretilmiş olan mikroorganizma kolonisinden öze ile lama alınan parçaya bir damla %30'luk hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılması ile yapılır. Enzim; damlatılan H_2O_2 'i, su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrıştırarak kabarcıkların oluşmasını sağlar. Dolayısı ile değerlendirmede kabarcık oluşturan kolonideki mikroorganizmalar katalaz enzimi yönünden pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Test tüpünde katalaz enziminin pozitif ve negatif tespitleri. Kabarcıklı tüp katalaz pozitif (solda), kabarcık olmayan tüp katalaz negatif (sağda) olarak yorumlanmaktadır (URL-8).

Pseudomonas aeruginosa'da laktaz enzimi bulunmadığı için Eosin methylen blue (EMB), McConkey ve Endoagar gibi laktoz içeren besiyerlerinde bulunan laktoz parçalanamaz ve inkübasyon sonucunda renksiz koloniler görülür. Laktaz pozitif mikroorganizmalarda mavi-siyah ve yeşilimsi parlak koyu koloniler görülür ve laktoz testi pozitif olarak yorumlanır.

Pseudomonas aeruginosa sahip olduğu ramnosil transferaz enzimleri ile yapısında ramnoz şekeri ve yağ asitleri bulunan, hidrofilik ve lipofilik kısımlardan oluştuğu için yüzey gerilimini azaltıcı emülsüfyer işleve sahip ramnolipit biyosümfektan salgılar (Şekil 1.10). Sümfektanlar, gıda sektöründe de sıklıkla kullanılan yüzey aktifleştiricilerdir. Sentetik olarak elde edilebildikleri gibi mikroorganizmalardan da elde edilmektedirler. Mikroorganizmalardan elde edilen biyosümfektanlar hem daha az toksik etkiye sahiptir, hem de değişen ortam koşullarına karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca diğer patojen bakteri ve küflere karşı da inhibe edici etkiye sahiptirler (Kahyaoğlu, 2008).



Şekil 1.10. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki açık sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril Luria Bertani Broth (LBB) (Karakaş, 2013).

Pseudomonas aeruginosa, en sık görülen ilk üç gram negatif patojenden biri olarak listelenir ve en kötü görsel hastalıklarla bağlantılıdır. Aynı zamanda birçok farklı kemoterapötik ajan (enfeksiyon veya tümoral hastalıkların tedavisinde kullanılan kimyasal bileşikler) ve antibiyotiğe karşı güçlü bir direnç sergiler ve bu da onu ortadan kaldırması çok zor bir patojen haline getirir (URL-1).

1.3. Virülans Faktörleri

Pseudomonas aeruginosa, fırsatçı bir insan patojenidir, çünkü sağlıklı, bağışıklık sistemi güçlü bireylerde enfekte olamaz. Bunun yerine, kistik fibroz, kanser veya Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) hastaları gibi bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı davranarak kolonize olur. O kadar güçlü bir patojendir ki, ilk olarak, kritik derecede hasta olan hastanede yatan hastalara saldırır ve bu genellikle daha invaziv hastalıklara işaret eder. *Pseudomonas aeruginosa* hücre yüzey organellerinden flagellum ve piliyi kullanarak ayrıca hücre dışı virülans faktörlerinden biri olan ekzotoksin-S'yi salgılayarak konağın doku yüzeylerine yapışır; daha sonra bulaşıcı sınırdaki popülasyonu oluşturmak için çoğalır ve son olarak diğer virülans faktörlerini kullanarak doku hasarı yapar.

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. *Pseudomonas aeruginosa* hücre yüzeyinde bulunan virülans

özellikle organel ve bileşenlere, hücre dışına salgılanan virülans enzimlere ve virülans toksinlere sahiptir. Bakterinin virülans faktörleri hücrenin morfolojik yapısı ile ilişkili olan ve hücre yüzeyinde bulunan ve hücre dışına salınan faktörler olarak 2 kategoride incelenebilir.

1.3.1. Bakterinin hücre yüzeyi ile ilişkili, yüzey virülans faktörleri

Flagella (kirpik): Patogenezde kritik bir role sahip olan kirpik, etkenin yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve bakterinin yüzme şeklindeki hareketinden sorumludur. Kamçı sayesinde bakteri, epitelyum hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar ve etkenin kolonizasyonunun başarısından sorumludur.

Pili (Fimbriae): *Pseudomonas aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklindeki hareketi sağlar fakat en önemli işlevi bakteriyi yüzeye yapıştırmaktır. Böylece bakterinin yüzeyde üremesi, kolonileşmesi ve biyofilm oluşturması kolaylaşmaktadır. Bakteri yüzeyindeki ince, kısa, düzgün tüycüklerdir. Sadece elektron mikroskopunda görülebilirler.

Aljinat: Mukoid yapıda bir ekzopolisakkarittir. Mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden oluşan bir yapısı vardır. Özellikle solunum yolu enfeksiyonlarında aljinat oluşması hastalığın gidişatını kötüleştirir ve tedavisini güçleştirir. Aljinat, bakterinin yüzeye yapışmasında rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Özellikle kistik fibrozis hastalarının solunum yollarından izole edilen suşlar aljinatın aşırı üretiminden dolayı mukoid yapıda suşlardır.

Slime faktör (biyofilm oluşumu): *Pseudomonas aeruginosa*'nın bazı uygunsuz koşullara karşı oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına “slime tabakası (biyofilm)” denir. Biyofilm yapısı, konağın bağışıklık sisteminden gelen tehditlere karşı bakteriyi, konak savunmasından korumaktadır (Maçın, 2014).

Lipopolisakkarit (LPS): LPS tabakası zaten gram negatif bakterilerin dış zarında kalın bir tabaka halinde bulunan ana bileşenlerden birisidir. *Pseudomonas aeruginosa* için önemli bir virülans faktördür çünkü fiziksel bir zar görevi üstlenir ve konak savunması ve antibiyotik gibi diğer etkilere bakteriyi korur. Ayrıca, LPS'nin yapısında bulunan lipid-A bileşeni kistik fibrozis trans membran regülatör

proteinine (CFTR) bağlanarak bakterinin solunum yüzeyine entegre olmasını sağlayan en önemli araçtır (Yavuz, 2018).

1.3.2. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından hücre dışına salgılanan virülans faktörler

Piyosiyanin: *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilerek hücre dışına salgılanan, mavi yeşil renkli bir pigmenttir. Konağın bağışıklık sistemi savunmasına karşı katalaz aktivitesini bozarak süperoksit (O_2^-) gibi reaktif oksijen türevleri üretir ve hücreye toksik şekilde nüfus edip hücreyi öldürücü ya da fonksiyonunu durdurucu etkiye neden olur.

Elastaz: Elastik yapıdaki dokularda bulunan, özellikle akciğer dokusu, bağ doku, deri ve diğer arterlerin genişleyip daralmasını sağlayan elastin proteininin yıkımını sağlayan, *Pseudomonas aeruginosa*'nın hücre dışına salınan enzimlerinden biridir. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarının başlangıç safhasında özellikle akciğerlerde kan damarlarındaki elastik tabakayı tahrip eder.

Proteazlar: *Pseudomonas aeruginosa* tarafından salgılanan alkali proteazlar, yüksek proteolitik göstererek, özellikle korneada ve akciğer alveolleri içindeki protein yapıdaki fibrinin parçalanmasına sebep olurlar. Buda *Pseudomonas aeruginosa*'nın akciğer infeksiyonlarına yardımcı olan en önemli hücre dışı ajanlarından biridir.

EkzotoksinA: *Pseudomonas aeruginosa* suşları tarafından üretilen, canlıların vücut hücrelerinde protein sentezine engel olan en önemli virülans faktörlerden biridir. Difteri toksini ile etki mekanizması aynı olsa da ekzotoksin A, difteri toksinine göre daha az toksik etki gösterir.

Fosfolipaz C: Lipid ve lesitin tabakalarını yıkıma uğratarak bakterinin dokulara geçişini kolaylaştıran bir hemolizindir.

Ramnlipid: *Pseudomonas aeruginosa*'nın salgıladığı biyosürekten madde olan ramnlipid, konağın akciğer hücrelerinde bulunan fosfolipidleri çözerek, fosfolipaz C'nin etki alanını artırır ve dolayısı ile bakterinin akciğer dokularına geçip burada kolonileşmesi ile biyofilm oluşumuna büyük katkı sağlar. Ayrıca ramnlipid

kirletilmiş topraklarda hidrokarbonların ortadan kaldırılmasına da yardımcı olan bir biyosüpfaktandır (Yavuz, 2018).

Virulans faktörlerinin salınımı; üremenin olduğu, hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar.

Bakteri virulans faktörlerini ne zaman salgılayıp salgılamayacağını iki farklı regülasyon sistemi tarafından kontrol eder. Bunlardan biri ikili komponent transkripsiyon düzenleyici sistem, diğeri ise Quorum Sensing (QS) sistemdir. Bu iki sistem bakterinin yaşaması ve konakta çoğalması için gereklidir (Sırıken ve Öz, 2017).

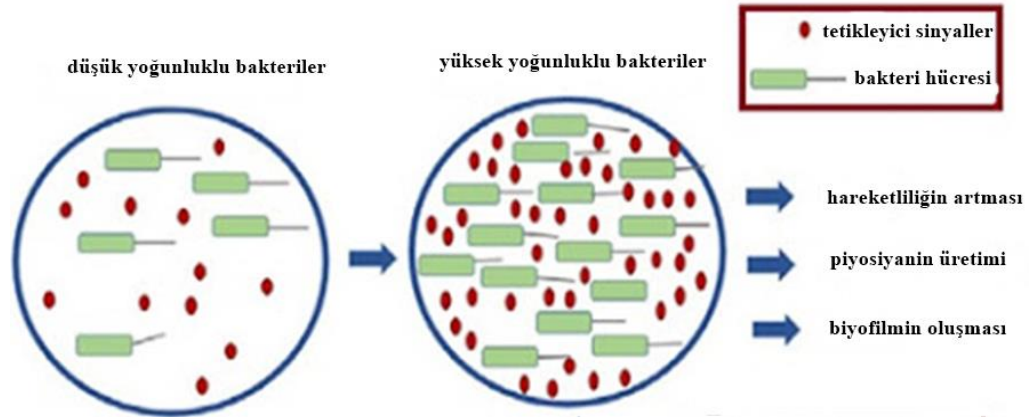
1.4. *Pseudomonas aeruginosa*' da "Quorum Sensing" Sistemi ve Biyofilm Oluşturması

1.4.1. "Quorum Sensing" sistemi

Bakteriler canlılıklarını sürdürmek için çevreden gelen özellikle tehdit içeren uyarıları algılayarak yanıt geliştirmek ve yeni çevre koşullarına uyum sağlamak zorundadırlar. Patojen bakteriler besin kaynaklarının az veya çok miktarlarda varlığı, bakterinin etrafında bulunan diğeri mikroorganizma yoğunluğu, ozmotik maddelerin baskısı, pH gibi çevresel faktörlerde meydana gelen olumsuz değişikliklere uygun olarak yaşam standardını sürdürmek amacıyla metabolizmasında birtakım düzenlemeler yaparlar. Çevresel koşulların uygun olup olmadığını ise zaten yapılarında var olan Quorum Sensing (QS) sistemi ile kontrol ederler. *Pseudomonas aeruginosa* QS sisteminden gelen sinyaller doğrultusunda aljinat salgılayarak yüzeye yapışır ve biyofilm geliştirmeye başlar. *Pseudomonas aeruginosa*'nın etrafında yaşamlarına çoğalarak devam eden diğeri mikroorganizmalar, onlardan daha güçlü ve dirençli olan *Pseudomonas aeruginosa* tarafından QS sistemi sayesinde, metabolik artıkları ve sayıları arttıkça tehdit unsuru olarak algılanmaya başlarlar. Bu sayede *Pseudomonas aeruginosa* aynı besin için yarışan diğeri bir bakteriye karşı da engelleyici salgılar salgılayarak rekabet edebilir ve konağın bağışıklık yanıtından kendini koruyabilmektedir (Temel ve Eraç, 2018).

QS sisteminin devreye girmesi etraftaki bakteri sayısı ile ilgilidir. Bu nedenle özellikle enfeksiyonların ilk aşamalarında mikroorganizma sayısı az olduğundan QS

sistemi aktive olmamaktadır ve bakterinin virulans faktörleri salınmamaktadır (Şekil 1.11) (Maçin, 2014).



Şekil 1.11. Bakteriyel infeksiyonların ilk aşamalarında bakteri sayısı azdır ve QS sinyalizasyon sistemleri aktivite olmamaktadır. Artan bakteri sayısı ile beraber hareketlilik artmakta, QS sistemi devreye girmekte ve virülans faktörler salgılanarak biyofilm oluşumu başlamaktadır (Asif, 2020).

Bunun yanı sıra biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında bakteriler biyofilm oluşturup güçlenebilmek amacıyla bitişiginde yer alan diğer bakteri hücrelerini uyarabilmek için de QS sistemini kullanırlar (Temel ve Eraç, 2018).

1.4.2. Biyofilm oluşumunun mikroorganizma açısından önemi

Biyofilm oluşturan bakteriler bu tabakanın içinde iken nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korunurlar, fagosite edilmeleri güçleşir ve canlı bünyesinde bağışıklık sistemi unsurlarının bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur. Biyofilm oluşturma'nın diğer bir avantajı da besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılmasıdır. Tehdit ortamı oluştuğunda patojen özellik gösteren bazı mikroorganizmalar tarafından değişik pek çok ortamda biyofilm oluşturulabilir (Şekil 1.12) (Gün ve Ekinci, 2009).



Şekil 1.12. Farklı yüzeylerde biyofilm yapısı (Biçer, 2018).

Biyofilm, mikroorganizmaların yüzeylere veya birbirlerine ürettikleri hücre dışı ekzopolisakkarit yapı ile geri dönüşümsüz olarak bağlandıkları çok çeşitli türden bakterinin bir araya gelmesiyle oluşan topluluktur. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kararı; savunma, adezyon ve koloni oluşturma gereksinimine, hücrelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine, bağlanılan yüzeyin özelliklerinden yüzey kimyası ve yüzeyin yapısına (pürüzlülük vs.), yüzey üzerinden akan akışkanın içeriğine (süt, dezenfektan, su vs.), yeterli sayıda mikroorganizma popülasyonuna, besin yararlanabilirliğinin düşük olması gibi çevresel stres koşullarına ve sınırlı besin içeriğine bağlı olarak gelişmektedir (Ayhan, 2016).

Biyofilm yapısında büyüyüp, çoğalan mikroorganizmalar, bir veya birkaç etkinin bir araya gelmesi ile antimikrobiyal maddelere ve dezenfektanlara karşı yüksek direnç gösterirler (Donlan ve Costerton, 2002).

Watnick ve Kolter (2000), biyofilm oluşum aşamalarını insanların yaşamaya karar verdikleri şehri seçmede izledikleri adımlar olarak tarif etmişlerdir. Onlara göre insanlar önce yaşayacağı şehri seçer, sonra şehirdeki ihtiyaçlarına en uygun mahalleyi seçer ve son olarak evini diğerlerinin evleri arasına inşa eder. İnsanların bazen de şehirdeki hayat bozulduğunda oradan ayrıldıklarını belirtmişlerdir. Bakteriyel bir biyofilmin oluşumunda da aynı adımların meydana geldiğinden bahsetmişlerdir. Yani; “İlk olarak, biyofilm oluşturmak için bakteri yüzeye o kadar yakından yaklaşır ki hareketliliği yavaşlar. Bakteri daha sonra yüzeye ve/veya daha önce yüzeye bağlanan diğer bakterilerle geçici bir ilişki oluşturabilir. Bu geçici ilişki, yerleşmek için bir yer aramasına izin verir. Bakteri, bir mikro koloninin bir üyesi olarak kararlı bir birliktelik oluşturduğunda, yaşayacağı mahalleyi seçmiştir. Son olarak, üç boyutlu bir biyofilm dikilirken binalar

yükselir. Bazen biyofilmle ilişkili bakteriler biyofilm matrisinden ayrılır.” şeklinde biyofilm oluşumunu tanımlamışlardır.

1.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*’nın biyofilm oluşturma yeteneği

Biyofilm içindeki mikroorganizmaların daha virülans olmasının yanı sıra, özellikle *Pseudomonas aeruginosa*’nın dış membran geçirgenliği düşük olduğu ve biyofilm içinde anaerob nitrat solunumu da yapabildiği için değişen çevresel faktörlere karşı daha iyi uyum sağlayarak gelişebilmekte, aynı zamanda antibiyotiklere karşı direnç de kazanabilmektedir (Ayhan, 2016).

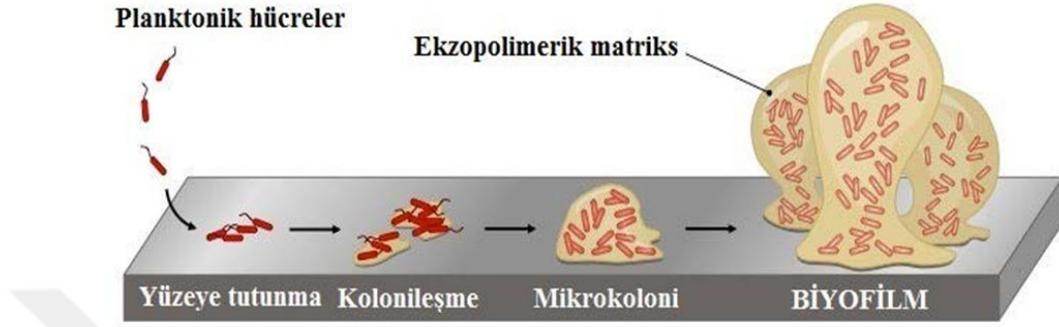
Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan ve aslında düşük sıcaklıklarda inhibe olabilen (55 °C’de 1 saat veya 60 °C’de 15 dakika) gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa*, üstün biyofilm oluşturma yeteneği ve çok hızlı direnç kazanma özelliğinden dolayı son yıllarda toplumda salgın hastalık yapma oranı yüksek mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır. *Pseudomonas spp.* genel olarak nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilen, zorunlu aerob bir bakteri olmakla beraber, bu cins içinde bulunan diğer türlerin aksine *Pseudomonas aeruginosa* terminal elektron alıcı olarak NO₃ kullanabilme özelliği nedeniyle anaerobik koşullarda da varlığını sürdürebilmektedir. Bu özelliği sayesinde biyofilm içinde hızla çoğalabilen, ortama en çok hâkim, en dirençli mikroorganizma olarak nitelendirilmektedir (Rasamivaraka vd., 2015).

Süt işletmelerinde; sağım hattından soğumaya gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan akan 25 °C’deki sütte, *Pseudomonas aeruginosa*’nın 30 dakika içerisinde tutunabildiği, soğutmadan işletmeye gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan geçen 4 °C’deki sütte ise 2 saat içerisinde tutunduğu belirtilmiştir (Açu vd., 2014).

1.4.4. Biyofilm oluşum mekanizması

Biyofilm oluşturmak amacı ile uyarılmış olan mikroorganizmalar arası tutunmaya ilk etapta yüzeyle organizma arasındaki elektrostatik etkileşim de yön verir ve dolayısı ile bu tutunma geri dönüşümlüdür. Ancak, bazı mikroorganizmaların salgıladıkları yapılar sayesinde bu bağ daha sıkı bir formda şekillenerek, biyofilm oluşumunun ikinci basamağı olan geri dönüşümsüz (irreversibl) bağlanma için avantaj sağlar.

Bakteri hücrelerinin membran proteinlerinden gelen uyarılar sonucu, ekzopolisakkarit (EPS) yapı salgılanır, bu salgı bakteriyi yüzeye yapıştırır ve geri dönüşümsüz bağlanma gerçekleşir. EPS sayesinde, bakteri hücreleri arasında köprüler kurulur, köprülerle bir araya gelen bakteriler yüzeyde kümeleşirler. Hatta bu sayede bakteriler yüzeyde sürekli kalabilmektedir (Şekil 1.13) (Sırıken ve Öz, 2017).



Şekil 1.13. Biyofilm oluşum mekanizması (Biçer, 2018).

Elektrostatik etkileşimler bakterinin ve yüzeyin negatif yüklü olduğu durumlarda itme kuvveti oluşturarak bakterinin yüzeyden uzaklaşmasına sebep olur ve yüzeye tutunmayı zorlaştırır. Fakat bakterinin sahip olduğu fimbria, pili gibi organeller ve özellikle gram-negatif bakterilerin hücre yüzeyinde fazlaca bulunan lipopolisakkarit yapı hidrofobik olduğu için oluşan itme kuvvetini azaltır. Bakteri özellikle fibrilleri (pili) sayesinde elektrostatik itme kuvvetini aşarak yüzeye yapışır (Biçer, 2018).

Biyofilmin oluşumunda ilk ve en kritik aşama tutunma aşamasıdır. Bu aşamada bakteriye ait flagellum, pili gibi yapısal özelliklerin yanı sıra, bakterinin tutunacağı yüzey özellikleri ve bakterinin içinde barındığı sıvının karakteri de biyofilm oluşumunu geciktirmekte veya hızlandırmaktadır. Yüzey maddesinin materyali, kaplaması, hidrofilik veya hidrofobik oluşu ile sıvının viskoz, durağan veya akışlı olması, besin ögesi içeriği veya tehdit edici unsurları barındırması önemli etkenlerdir. Paslanmaz çelik ve cam yüzeylerin hidrofilik özellikte olmalarından dolayı, plastik, teflon gibi hidrofobik yüzeylere göre daha hızlı biyofilm tabakası oluştuğu, ancak plastik yüzeylerdeki tutunmanın da daha güçlü olduğu belirtilmiştir (Ayhan, 2016).

Biyofilmin ilk aşaması olan tutunma safhasında, mikron boyutlarında olan bakteriye sıvı moleküllerinin çarparak, bakteriyi Brownian hareketine maruz bırakması da bakterinin yüzey ile arasındaki yörüngesini değiştirmektedir. Brownian hareketi bir

sıvıda yüzen veya asılı duran parçacıkların birbirleri ile çarpışması sonucu oluşan, düzensiz, rastlantısal harekettir. Mikro ölçekli bakteriler su, mukus ve kan gibi viskoz sıvılar içinde hareket ettiğinden, sıvı ile bakteriler arasındaki viskoz sürtünme kuvvetleri de bakterinin hareket hızını ve yönünü etkiler. Brownian dalgalanmaları, biyofilm oluşumunda karmaşık bir rol oynar: dalgalanmalar, hücrelerin yüzeyden ortalama mesafesini arttırır, ancak aynı zamanda hücreleri anlık olarak yüzeye yaklaştırabilir ve böylece yapışma olasılığını artırabilir (Conrad, 2012).

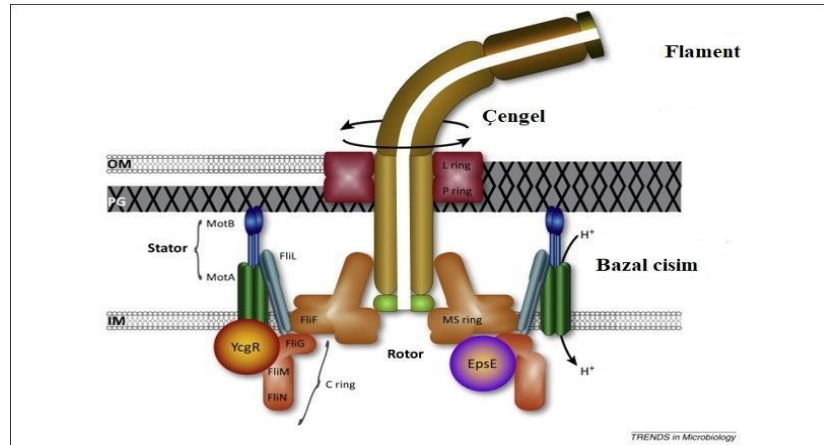
Bakteriyel hareketlilikte etkili faktörlerden biri kamçıdır. Bakterilerin hemen hemen yarısı kamçı adı verilen bir organ yardımıyla hareket edebilir. Kamçı ile bakteri, yüzebilir ya da kayma hareketi ile yer değiştirebilir. Kamçı ipliğimsi, dallanmış, kıvrımlı bir organdır. Ait olduğu bakteri boyunun 4-6 katı uzunluktadır.

Kamçı başlıca 3 bölümden oluşur;

Filament: Flagellin adlı proteinden oluşan, hücre yüzeyinden uzanan, sert ve kıvrımlı kısım.

Çengel: Filamenti bazal gövdeye birleştiren esnek kısım.

Bazal gövde: Kamçının dönmesini ve bakterinin hareketini sağlayan bölümdür (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Bakteri kamçısının genel yapısı (Belas, 2014).

Bakteriler, biyofilm oluşumunda yüzeye tutunabilmek için yüzerlerken, yüzeyle aralarında meydana gelen hidrodinamik etkileşimler kamçılı yüzmenin şeklini ve yönünü değiştirir. Kamçı bakterinin hidrodinamik sürüklenme hareketi ile sıvı içinde

yer değiştirmesini sağlarken ayrıca hücre gövdesini yukarı doğru işaret edecek şekilde döndürür ve bu sayede bakteri sıvının akış yönüne ters yönde yüzerek hızla yayılır (Kaya ve Koser, 2012).

Sıvıların dairesel hareketleri, doğrusal hareketlere göre bakteriyi yüzeye daha fazla yakınlılaştırmaktadır. Bu da bakteri ile yüzey arasındaki hidrostatik çekimi arttırmakta, bakteri yüzeye daha kolay yapışmakta ve sonuç olarak bakteri birikimi ile yüzeyde biyofilm tabakası oluşmaya başlamaktadır. Biyofilm oluşumuna başlayan bakteri, artık flagellum kullanarak sıvının içinde serbest bir şekilde yzememektedir (Conrad, 2012).

1.5. Biyofilmlerin Süt ve Diğer Sektörlerde Yol Açtığı Sorunlar

Biyofilmler bakterilerin yer aldığı tüm endüstriyel sektörlerde sık karşılaşılan ve bakteriyel inhibisyonu zorlaştırdığı için de mücadelesi zor olan oluşumlardır. Biyofilmler, tıp, medikal, dişçilik, gıda, evre, tarım ve hayvancılık gibi sektörlerde bakterilerin pek çok dezenfektana, ısıya, pH değişimlerine, susuzluk ve besinsizlik gibi olumsuz koşullara karşı dirençli ve dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Biyofilm yapısının dolgu materyalini oluşturan ekzopolisakkarit kısım, bakterinin ihtiyaç duyacağı tüm besin unsurlarını bünyesinde barındırmaktadır.

Hastanelerin en çok mücadele ettiği infeksiyon hastalıklarının temel kaynağını da, biyofilm içinde bulunan ve biyofilm oluşturma eğilimi yüksek olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalar oluşurmaktadır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp i zarı iltihabı, periodontit, kistik fibroz gibi hastalıklarda en sık karşılaşılan mikroorganizmalardır (Gün ve Ekinci, 2009).

Dişlerde, protezlerde ve implantlarda oluşan biyofilmler canlılarda; çürük, periodontitis ve stomatitlerin asıl nedenidir. Ayrıca biyofilm tabakasında bulunan bakteriler, aēız ve tükürük yoluyla canlı organizmanın diğer organlarına geçiş yaparak, daha farklı infeksiyonlara da sebep olabilmektedir (Türkcan ve Nalbant, 2015).

Bakteri sulu ve düşük besin içerikli stres ortamlarında ekzopolisakkarit yapı salgılayarak yüzeye tutunmayı başlatır. Fakat zamanla artan ekzopolisakkarit yapı, etraftan gelen besinleri iyon reçinesi gibi davranarak kendine eker. Böylece

biyofilm yapısını güçlendirir ve bünyesindeki bakterilerin, yeterli besin ve konfor ortamından dolayı hızla üreyerek çoğalmasını sağlar. Belli bir sayıya kadar çoğalıp olgun biyofilm tabakasını oluşturan bakterilerde artık biyofilmden kopmalar ve diğer bölgelere bağımsız yayılmalar başlamaktadır. Bu da kontaminasyonun ve tüm ekipman yüzeyinin biyofilm ile kaplanmasının ilk basamağıdır. Çoğalan bakterilerin oluşturduğu amonyak, organik asitler, karbondioksit, hidrojen sülfat, sülfürik asit üretimi ve daha fazla indirgenmiş kükürt bileşimi gibi metabolik atık maddeleri ekzopolisakkarit yapı içindeki drenaj kanallarından yapışmanın sağladığı yüzeye bırakılır (Gün ve Ekinci, 2009; Lee vd., 1980; Türetgen, 2005) ve yüzeyde mekanik deformasyonlar oluşmaya başlar. Benzer şekilde biyofilmlerden dolayı korozyona uğrayan gemilerin yakıt boruları delinmekte, gemiler tamirat için haftalarca karaya çekilmekte ve sefere çıkamamaktadır (Türetgen, 2006). Yüzeylerde oluşan mekanik hasarlar, işletmelerde malî zararlara sebep olmaktadır.

Kentlerin su dağıtım sistemlerindeki boru hatlarında oluşan biyofilmler, suyun renginde, kokusunda ve tadında değişikliklere sebep olmakla beraber, Asellus ve Nais gibi çıplak gözle görülebilen ve istenmeyen organizmaların besin kaynaklarını oluşturup çoğalmalarını hızlandırarak suyun kalitesini düşürmektedirler (Hallam vd., 2001; Servais vd., 1995).

Biyofilmler süt sektörü ve diğer gıda sektörlerinde en fazla boru çeperlerinde, bağlantı vanaları ve plastik contalarında, süt transfer hatlarının özellikle dirsek kısımlarında ve diğer ekipmanlarında, plakalı ısı değiştiricilerde, gıda taşıyıcı bantlarda, soğutma ve depolama tanklarının yüzeylerinde oluşmaktadır (Ayhan, 2016). Oluşan biyofilm tabakası, gıda sektöründe ısının yüzeylerden iletimini geciktirmekte, sıvıların yüzey ile arasındaki sürtünme direncini arttırdığı için akış hızını düşürmekte, dolayısı ile çalışma sürelerini uzatmakta, uygulanan tekniklerin yetersiz kalmasına sebep olmakta ve nihayetinde son ürünlerde mikrobiyal kontaminasyonlara sebep olmaktadır. Literatürde gıda sektöründe farklı ortamlarda biyofilm yapısını incelemeye yönelik çok fazla çalışma olmamasına rağmen aslında, yüksek besin ve bakteri içeriği ile her zaman temas halinde olan gıda endüstri yüzeylerinde mikrobiyal kolonizasyon riski oldukça fazladır. Süt sektöründe biyofilm oluşması, yapılan temizlik ve sanitasyon işleminin yetersizliğinin, eskiyen,

yüzey korozyonu artan ve onarıma ihtiyaç duyulan ekipmanların yenilenmemesinin de bir göstergesidir.

Süt işleme tesislerinde genellikle 304 kalite, 2B soğuk haddeleme ile üretilmiş ve elektro parlatılmış yüzeye sahip paslanmaz çelik yüzeyler kullanılmaktadır (Ayhan, 2016). Her türlü ısıtma-soğutma-depolama tankları, süt aktarım boru hatları, üretim tekneleri, kazanları, güğümler ve her türlü karıştırıcı, parçalayıcı alet-ekipmânlar paslanmaz çelikten üretilmektedir. Bağlantı borularının contaları, kasalar, konveyör bantlar, temizlik fırçaları ve diğer kova, hortum vs. gibi ekipmânlar ise kullanım kolaylığı, işlevselliği ve dayanıklılığı açısından plastik ve türevlerinden üretilmektedir. Plastik yüzeylerde, paslanmaz çelik yüzeylere göre bakteri tutnumu daha güçlü olmakta ve biyofilm ile mücadele daha fazla zorlaşmaktadır (Holah ve Thorpe, 1990).

Süt ve gıda işletmelerinde kullanılan sularda oluşmuş olan bir biyofilm tabakasından kopan bakteri topluluğu, buradan paketlenme makinalarına veya sterilizasyonu yapılmış gıdaya çapraz bulaşma yoluyla bulaşabilmekte, nihayetinde bitmiş üründe bozulmalar, işletmede de ekonomik kayıplar ve itibar zedelenmesi oluşabilmektedir (Brooks ve Flint, 2008).

Gıda ve tıp sektörü açısından bakteriyel kontaminasyonun en önemli kaynaklarından biri olan biyofilm oluşumu ile mücadele etmek yüksek önem arz etmektedir. Literatür incelendiğinde çeşitli sektörlerde, yüzeylerde ve biyofilm oluşturan farklı bakterilere karşı biyofilm yapısını engellemeye veya oluşmuş biyofilm tabakasını ortadan kaldırmaya yönelik pek çok çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Biyofilm oluşumunu engelleyici ya da oluşmuş biyofilmi parçalayıcı ajanların ve dezenfektanların kullanımı, enzimler ile muamele ya da kaplama çalışmaları, mekanik temizleme yöntemlerinin geliştirilmesi, antimikrobiyal ajanlar ya da metaller kullanarak bakterinin biyofilm oluşturma mekanizmasının çökertilmesi gibi yöntemlere dair çalışmalar yapılmıştır.

Süt işletmelerinde, gram pozitif bakterilerden laktik asit bakterileri, *Staphylococcus spp.*, gram negatif bakterilerden *Pseudomonas spp.* ve Koliform bakteriler, ayrıca mayalar çeşitli yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturan mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Ayhan, 2016).

Özellikle sahip olduğu ajanlar sayesinde kuvvetli biyofilm oluşturma özelliği bulunan *Pseudomonas aeruginosa*, uygunsuz sağım koşullarında süte direkt olarak bulaşabilen fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır. Toprakta, suda, insan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunur. Dolayısı ile sağım alet ve ekipmanlarından, ıslak ahır ortamlarından ve hijyen kurallarına dikkat etmemiş personelden süte rahatlıkla kontamine olabilmektedirler. Hızlı biyofilm oluşturup, kendini bu yapı içinde koruma altına aldığından dolayı dezenfektanlara, ısı değişimlerine, ultraviyole (UV) ışınları ve pH değişimlerine karşı oldukça dayanıklıdır. Bundan dolayı süt sektöründe mücadelesi zor bir mikroorganizmadır (Şen ve Halkman, 2006).

1.6. Lizozim ve Antibakteriyel Etki Mekanizması

Lizozim, özellikle gram pozitif bakterilerin kalın hücre duvarında fazlaca bulunan peptidoglikan tabakasının monomeri, N-asetil glikozamin ve N-asetil muramik asit'i aralarındaki β (1-4) bağlarını hidrolize etmek kaydı ile parçalayan ve böylece bakteri hücre duvarının erimesine sebep olan heteropolisakkarit grubuna dâhil bir enzimdir. Canlı organizmalarda doğal immünolojik ajan olarak, bağırsak ve solunum yollarının epitel hücre katmanlarında, tükürük, gözyaşı, anne sütü, idrar, kan serumu ve yumurta beyazının yapısında bulunmaktadır (Deckers vd., 2008).

İlk defa 1922 yılında Alexander Fleming, petri kabına hazırlamış olduğu bakteri preperatı ile kendi burun mukozasını inoküle etmiş ve inkübasyon sonunda burnundan alıp petri kabına koyduğu mukusun etrafında inhibisyon zonunun oluştuğunu gözlemlemiştir. Buna sebep olan enzimi lizozim olarak isimlendirmiştir (Çorman, 2010).

1965 yılında, David Phillips tarafından tavuk yumurtasından izole edilen enzimin, X ışınları kullanılarak elipsoidal yapıda olduğu, 45x30x30 angstrom boyutlarında, 14600 dalton ağırlığında ve 129 aminoasit biriminden oluştuğunun tanımlaması yapılmıştır (URL-9).

1993 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/ Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) tarafından yasalarla gıdalarda kullanımına izin verilen, toksik olmayan antimikrobiyal enzimdir (Üstümkol, 2006). Süt ürünleri üretiminde, şarap üretiminde,

kırmızı-beyaz et üretiminde koruyucu olarak, farmakoloji ve eczacılık sektöründe ülser enfeksiyonlarının giderilmesinde kullanım alanı bulunmaktadır. 0.3-0.4 g arası lizozim içeren kurutulmuş tavuk yumurtası beyazı, ticari olarak en ucuz ve en kolay lizozim elde edilen kaynaktır. Tavuk yumurtası beyazından, kristalizasyon işlemi ile %70-80'lere varan randımanlarda lizozim elde edilebilmektedir (Arıca ve Bayramoğlu, 2004; Çorman, 2010; Üstünkol, 2006). Lizozimin antibakteriyel etkisi hidrolitik özelliğinin yanında katyonik ve hidrofobik olmasından, bulunduğu ortamda sinerjist veya antogonist etkileşebileceği başka maddelerin varlığından da kaynaklanmaktadır (Deckers vd., 2008; Pellegrini vd., 1992).

1.7. Antibakteriyel Gümüş ve Gümüş Anot Tekniği

Gümüşün antimikrobiyal etkisi antik çağlara dayanan oldukça eski bir tespittir. M.Ö. 3100' den beri Mısırlılar, Persler ve Çinliler tarafından gıda koruma ve sağlık sorunlarını gidermede kullanılmıştır. Sümerliler döneminde şehre su taşıyan borular gümüşten yapılmış, Eski Batı süt kaplarının içine bozulmayı engellemesi için gümüş paralar atmış, yanık, yara ve kronik ülser tedavilerinde etkili bir tedavi edici ajan olarak kullanılmıştır (Altuner, 2014; Seçinti, 2010). M.S. 980'de İbni Sina tarafından kanı temizleme, çarpıntı giderme ve ağız kokusunun tedavisinde gümüş kullanılmıştır. 17. yy. da Angelo Sala isimli İtalyan doktor ruhsal travmatik durumların tedavisinde sistemik gümüş nitrat kullanmıştır (Seçinti, 2010). Gümüşün antibakteriyel etkisine dair ilk bilimsel tespit, 1869 yılında Raulin'in gümüş kaplarda *Aspergillus niger* yetiştiremediğini gözlemlemesi ile yapılmıştır (Hoş, 2010). 1800'lü yıllarda göz enfeksiyonlarının giderilmesinde damla olarak kullanılmış ve bundan sonraki süreçlerde gümüş ile antibakteriyel tedavi yerini penisilin kullanımına bırakmıştır (Beykaya ve Çağlar, 2015; Nies, 1999). İkinci Dünya Savaşı sırasında oluşan yanık yaralarının tedavi süreci ağır geçmiş ve 1965 yılında C.A. Moyer tarafından *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucu %0.5'lik gümüş nitrat içeren çözeltinin *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli*'ye antibakteriyel etki gösteren minimum konsantrasyon olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta geniş yüzey alanına sahip ve ikinci derece yanıkların tedavisinde hayli başarılı yol kat edilmiş ve gümüşün kuvvetli antibakteriyel etkisi tekrar gündeme gelmiştir (Klasen, 1999).

Literatürde gümüş maruziyetinden kaynaklanan metabolik bozuklukların olduğu bildirilmemiştir. Gözlemlenebilen en yaygın lokâl ve fiziksel değişiklik argyria ve argyrosisdir (Mijnendonckx vd., 2013). Argyria, cilt tarafından emilmeyen gümüşün veya gümüşlü bileşiklerin direkt ve sistemli bir şekilde, yutma ile veya bazı tıbbi ajanlardan implantasyon yoluyla vücuda girmesi ile oluşan ve özellikle güneş ışığında cildin mavi-gri pigmentasyon gösterdiği dermatolojik bir sorundur (Kwon vd., 2009; Nguyen vd., 1998).

Literatürde argyriyanın oluşabilmesi için gerekli ortalama maruziyet dozunun 3.8 g elemental gümüş olduğu, tetel gümüş dozunun 10-30 g arası olduğu bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Çevre Koruma Ajansı' nın yayınladığı bildiriye göre ise; oral gümüş maruziyeti, kişi başına ortalama referans değer 5 µg/kg/gün, kişi başına kritik toksik maruziyet dozu ise yaklaşık 14 µg/kg/gün olarak bildirilmiştir (Kwon vd., 2009).

Gümüş inert, toksik ve allerjen özelliği en az olan, canlının yararlı doku ve hücre enzimlerini yıkmadığı için güvenilir, düşük konsantrasyonlarda bile etkili antibakteriyel özellik gösterebilen yani oligodinamik bir metaldir (Agnihotri vd., 2014; Chung vd., 2016; Kılınç ve Sürengil, 2015; Mlalila vd., 2017; Prasher vd., 2018). Gümüşün; bakteri hücresinin sülfür, oksijen ve azot içeren tiol (-SH) gruplarına bağlanarak bakteri proteinlerini denatüre ettiği, hücre duvarı ve stoplazma zarını büzleştirerek bakteri deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribo nükleik asit (RNA)'sının zarar görmesini, bu sayede bakteri üremesini engellediği bildirilmiştir (Seçinti, 2010). Ayrıca zar geçirgenliğini düşürdüğü, solunum enzimlerini inaktifleştirerek bakteri solunumunu durdurduğu ve hidrojen iyonu ile yer değiştirerek proton sızıntısına sebep olmak kaydıyla bakteriyi enerjisiz bırakıp hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Altuner, 2014; Beykaya ve Çağlar, 2015; Bilgin, 2010; Percival vd., 2005).

Tıpta uygulanan antibiyotik tedavilerine karşı bakteriler zamanla antibiyotiğin etki mekanizmasını tanıyıp direnç geliştirebilmektedirler. Ancak gümüş, bakteri ve virüslerin metabolizmasını tahrip ettiği için mikroorganizmada savunma mekanizması oluşmamaktadır (Seçinti, 2010). Antibiyotiklerin aksine gümüş, bakterilerin hücre bileşenlerinin pek çok mekanizması için toksiktir. Gümüş iyonlaşmadan özellikle kendi etrafında antibakteriyel etki gösterse de zayıf bir

polarlanma sayesinde çabukça iyonlaşabilmekte, elektrik akımının itici gücü ile gümüş iyonları daha uzak mesafelere ulaşmakta ve oluşan antibakteriyel etki alanı genişlemektedir (Aydın, 1997). Gümüşün iyonik formda ortama sürekli salınması pek çok bakterinin solunumunun durmasına, dolayısı ile bakteri ölümüne ve geniş bir aktivite spektrumuna sebep olmaktadır (Leaper, 2006).

Gümüşün elektrik akımı ile iyonlaşarak salınımı; bir adet güç kaynağı, bir adet potansiyometre ve birer adet anot ve katot kutup bağlantılarından oluşan basit bir elektriksel devre ile sağlanmaktadır. Elektrik devresinin anot elektroduna gümüş metali yerleştirilerek zayıf doğru akım verilip gümüşün iyonlaşması ile sağlanan antibakteriyel etki tekniğine “Gümüş Anot Uygulaması” denilmiştir. Literatürde gümüş anot uygulamasının antiviral (Rogers vd., 2008), antifungal (Kim vd., 2009), antiinflamatuvar (Nadworny vd., 2008), antiantiyogenik (Gurunathan vd., 2009), antikanserojen (AshaRani vd., 2009; Sriram vd. 2010) ve antibakteriyel (Hukiç vd., 2018; Seçinti vd., 2008; Seçinti vd., 2009) etkilerine dair çalışmalar mevcuttur.

Teknik olarak iyontoforez sistemine benzese de, etki alanı ve sınırı açısından iyontoforez sisteminden farklı bir uygulamadır. İyontoforez sisteminde de tercihen gümüş anot ve katot kutuplar kullanılmaktadır ancak, bu sistemde iyonlaştırılan maddenin elektrik yüküne göre ters yükteki taşınacak maddenin bir birlerini bağlayarak bir yerden diğer yere taşınması sağlanmaktadır. Bu anlamda özellikle vücutta kontrollü salınımında verilecek ilaçlar ile yapılacak olan tedavide kullanım alanı bulmaktadır. Uygulanan elektrik akımı arttıkça iyonlaşan madde miktarı da artmakta buna paralel olarak da taşınan madde miktarı da artmaktadır (Aydın, 1997; Özdin, 2011). Gümüş anot sisteminde anot kutuptan iyonlaşan gümüşün büyük bir kısmı herhangi bir madde ile bağ yapmamakta, ortamda emülsüfiyer halde bulunan gümüşün antibakteriyel etkisi belirli bir amper değerine kadar artmakta, sonrasında uygulanan akım arttırılsa bile oluşan antibakteriyel etkide bir değişiklik ya da artma oluşmamaktadır. Literatürde gümüşün 20 μA 'den fazla akım uygulanarak iyonlaştırıldığında antimikrobiyal etkinin artmadığı, sabit kaldığı gözlemlenmiştir (Aydın, 1997; Hukiç vd., 2018). Gümüşün iyonlaşması için gereken akım miktarı diğer metallere göre daha düşük seviyelerdedir. Bu da özellikle biyolojik uygulamalarda daha az risk oluşturmaktadır. Bakır, çinko, titanyum ve çelik metalleri 1.4 Volt (V)'luk bir gerilim uygulaması ile ancak iyonlaşırken, gümüşün iyonlaşması

için gereken gerilim ihtiyaı 0.2 Volt'tur (Aydın, 1997). Ayrıca yapılan çalışmalarda uygulanan elektrik akımı kesilse dahi ortamda var olan gümüş iyonları sayesinde mevcut antimikrobiyal etkinin haftalarca sürdüğü de belirtilmiştir (Spadaro, 1985).

Bu çalışmanın amacı; süt üretim çiftliklerinde, küçük, orta ve büyük ölçekli süt ve süt ürünleri üretim tesislerinde, süt depolama tanklarında, tüm proses ekipmanlarında, nakliye araçlarında ve çiğ süt analiz cihazı hatlarında, çiğ sütün sürekli teması sonucu, doğal florasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı oluşan biyofilmin, gümüş anot tekniğı ve lizozim enziminin tek başlarına ve beraber sinerjist etkileri ile önlenebilirliğini incelemektir. Ayrıca lizozimin ve gümüş anot tekniğinin, çiğ sütün soğuk muhafaza koşullarında, muhafaza süresi boyunca, *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimi üzerindeki etkileri de koloni ekim yöntemine göre gözlemlenecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sağım anından itibaren çiğ sütteki bakteri yükü, sıcaklık ve süre ile orantılı bir şekilde ve hızla artmaktadır. Ergüllü ve Üçüncü (1982), farklı bölgelerden temin edilen 25 adet çiğ süt örneğini 4, 12, 20 ve 30 °C’ler deki sıcaklık ortamlarına 6 ve 24 saat maruz bırakıp, mikrobiyal gelişimi koliform bakteriler ve toplam bakteri açısından incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda 20 °C ve 30 °C’deki sütlerde 6 saat sonunda başlangıçta ml’de 7.700.000 olan toplam bakteri sayısının sırası ile 68.500.000 ve 97.000.000’a ulaştığını, yine bu sıcaklıklarda 24 saatlik sürede toplam bakteri sayısının milyarlarca ulaştığını ve sütlerin kesildiğini gözlemlemişlerdir. Koliform grubu bakterilerde de sıcaklık arttıkça bakteri sayısının başlangıca göre arttığını, başlangıçta ml’de 4000 adet olan koliform bakteri sayısının 30 °C’de 6 saatlik sürede 310.000’e, 24 saatlik sürede ise 1.100.000’e ulaştığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu sıcaklıklarda sütlerde asit yapan bakterilerin geliştiğini fakat asit oluşturmeyen bakterilerin gelişmediğini gözlemlemişlerdir (Ergüllü ve Üçüncü, 1982).

Çiğ süte çoğunlukla hijyenik olmayan sağım ortamlarından bulaşarak, insanlarda ciddi sağlık sorunlarına ve üründe bozulmalara yol açan *Pseudomonas aeruginosa*’nın, kuvvetli biyofilm oluşturmada QS sisteminin rolü büyüktür. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*’nın flagellum ve tip dört (tip-IV) pili organellerine sahip olması ve bu sayede hareket kabiliyetinin bulunması, biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan tutunma safhasını hızlandırmaktadır.

Schaber vd. (2004), *Pseudomonas aeruginosa*’nın QS sisteminin kaybının virülans faktörlerini nasıl etkilediği üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, quorum sensing sistemi olmayan veya kaybolmuş olan suşların daha zayıf biyofilm tabakası ürettiklerini ve daha az virülans olduklarını gözlemlemişlerdir.

Conrad (2012), tarafından yapılan bir çalışmada biyofilm oluşumundan önce, *Pseudomonas aeruginosa*’nın yüzeylere yakın hareket etmek için iki hareketlilik eklentisini kullandığından bahsedilmiştir. Sarmal bir pervane görevi gören tek bir polar flagellum (kamçı) ve doğrusal hareket motoru olarak görev yapan çoklu tip dört (tip-IV) pilinin bakterileri yüzeylere ve birbirlerine yapıştıran yapıştırıcılar olarak görev yapabildiğini söylemiştir. *Pseudomonas aeruginosa*’ da hücre yüzey

virölans faktörü olarak bulunan flagella ve pilinin biyofilmin ilk oluşum aşamasındaki rolünün büyüklüğünden bahsetmiştir.

Biyofilmler hem endüstriye, hem de sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle gıda sanayinde ve sağlık sektöründe oldukça önemlidir. Mikrobiyel biyofilmler; aletler üzerinde oluşturdukları mekanik hasarlar ve tabakalar ile enerji veriminin düşmesine, enerji kaynaklarında israfa ve ekonomide kayıpların oluşmasına, ürün kontaminasyonları ve suların arıtılmasını zorlaşması vesilesiyle infeksiyon hastalıklarına ve nihayetinde toplum sağlığının olumsuz etkilenmesine, hastane hijyeninin zorlaşmasına, toplumun antibiyotik direncinin artmasına neden olmaktadır.

Lee vd. (1980), su kalitesinde değişikliklere neden olan metal oksidasyonunun sebeplerini, musluk suyu ve steril su içeren, poli vinil klorür (PVC) ve çelik borulu bir sistemle simüle ederek araştırmış ve çalışmaları sonucunda sistemdeki boru yüzeylerinde mikrobiyal birikintilerin zamanla istikrarlı bir şekilde arttığını ve bunlarında sülfat indirgeyici organizmalardan oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Demir borularda meydana gelen korozyonu, kilo kaybı analizleri ile tespit etmiş, mikrobiyal popülasyonların doğrudan korozyonun artması ile ilişkili olduğunu, kısa sürede boru duvarlarının pH ve Eh değerlerini değiştirdiklerini tespit etmişlerdir.

Biçer (2018), *Basillus subtilis* suşunun biyofilm oluşturmasını engellemeye yönelik yapmış olduğu bir çalışmada bakterinin biyofilm yapısını oluşturmasından sorumlu olan nükleotid c-di-guanozin mono fosfat (GMP) ile akridin türevlerini sentezleyerek, G-kuadrupleks'in oluşmasını ve böylece bakterinin biyofilm oluşturan yapılarında inaktivasyon sağlandığını gözlemlemiştir.

Sert (2014), paslanmaz çelik yüzeye, sol-jel tekniği ile lizozim enzimini kaplamış ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmaya karşı etkisini gözlemlemiştir. Bu amaçla dört adet paslanmaz çelik kupon kullanmıştır. Bunlardan birini kontrol grubu olarak boş kullanmış, ikinciye fonksiyonel amin / karboksil gruplarını içeren kaplama, üçüncüye fonksiyonel amin / karboksil gruplarının üzerine poli-akrilik asit kaplama, dördüncü ve son gruba fonksiyonel amin/ karboksil gruplarının üzerine poli-akrilik asit kaplama yapmış ve lizozim enzimini kovalent olarak bağlamıştır.

Çalışmalar sonucunda en iyi anti-biyofilm etkisini lizozim enziminin kaplı olduğu son grupta tespit etmiştir.

Turgut (2016), bazı tıbbî bitkilerin distilasyon yolu ile uçucu yağlarını elde etmiş ve bu yağların *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Echericia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sciuri* ve *Enterococcus faecium*’ a karşı anti-biyofilm aktivitesini ölçmüş, sonuçta en iyi anti- biyofilm etkisini *Pinus nigra* bitkisinde ve *Staphylococcus sciuri*’ ye karşı 24. saatte gözlemlemiştir.

Gözün oküler yüzeyinden izole edilen *Staphylococcus epidermis* ve *Basillus cereus*’un biyofilm aktivitesini engellemeye yönelik yapılan bir çalışmada, bazı laktik asit bakterilerinin ürettiği ekzopolisakkaritler kullanılmıştır. *Staphylococcus epidermis* ’ e karşı en iyi anti-biyofilm etki *Lactobasillus plantarum* ’un ürettiği ekzopolisakkaritten, *Basillus cereus* ’a karşı en iyi anti-biyofilm etki de *Lactobasillus rahamnosus* ’un ürettiği ekzopolisakkaritten alınmıştır (URL-10).

Kırmusaoglu (2018), ortopedik implant yüzeylerinde bazı biyofilm oluşturan patojenik bakterilere karşı bakırın antibakteriyel etkisinin olduğunu, içlerinde *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*’da bulunan tüm patojen biyofilm oluşturan bakterilerin 0.75 mg/ml bakır seviyesinde inhibe olduklarını belirtmiştir.

Wellman vd. (1996), bakteriler üzerinde antibiyotik ve elektrik alan uygulamasının antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerini gözlemledikleri çalışmalarında, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinde, tobramisin antibiyotik maddesi ile birlikte uygulanan elektrik akımının 8 log değerinde azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir. Çalışmayı *Pseudomonas aeruginosa* suşu, litre başına 5 mg tobramisin ve 1 mA akım ile birkaç kez tekrarlamış ve her seferinde tutarlı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Pseudomonas aeruginosa’nın biyofilm yapısına karşı dezenfektan olarak sodyum hipoklorit kullanımı (Mataracı ve Gerçeker, 2011), lizozim enziminin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmini önemli boyutta engellediği (Eladawy vd., 2020), metallerin antibakteriyel etkisine dair gümüş sülfadiazinin *Pseudomonas aeruginosa*

biyofilmine karşı oldukça etkili olduğu (Bjarnsholt vd., 2007) yapılan çalışmalardan bazılarıdır.

Lizozim, gram pozitif bakterilerin kalın peptidoglikan tabakasını parçalayarak antibakteriyel etki sağlayan bir enzimdir. Ancak gram pozitif bakterilerden sadece küçük bir kısmın lizozime duyarlı oluşu ve çoğu gram pozitif bakteride peptidoglikan tabakasının bu enzim için doğrudan erişilebilir olmamasından dolayı, lizozimin antibakteriyel etkisinin sadece muramidaz özelliğinden dolayı olmadığına dair iddialar ortaya atılmıştır. Enzimin aşamalı olarak ısı ile denatüre edildiği halde gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin devam ettiği tespit edilmiştir (İbrahim vd., 2001a).

Muaramidaz etkinliği inaktif hale getirilmiş lizozimin ve muarmidaz etkinliği inaktif hale getirilmemiş lizozimin, ısı ile denatürasyon sonucu aynı antibakteriyel etkiye sahip olduğu ancak muaramidaz inaktif lizozimin diğerine göre *Basillus subtilis*'e karşı daha güçlü bakteri öldürücü etki gösterdiği de gözlemlenmiştir. Bu gözleme dayanarak lizozimin bakterilerin peptidoglikan tabakasına bağlanıp bakteriyi öldürmesinin, enzimatik aktiviteden ziyade, pozitif yüklü lizozim ile negatif yüklü bakteri hücre duvarı arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanabileceği, yani lizozimin yapısal özelliklerinden dolayı bakteri öldürücü özelliğinin bulunduğu da belirtilmiştir (İbrahim vd., 2001a).

Bu konuda İbrahim vd. (2001b), tarafından yapılmış başka bir çalışmada; tavuk yumurtası akından elde edilen lizozimin, gram negatiflere olan antibakteriyel aktivitesinin etki nedeni araştırılmıştır. Çalışmalar sonunda antibakteriyel etkinin enzimatik etkiden kaynaklanmadığı, enzimin sarmal yapısının aktif üst yarığında bulunan halka yapısındaki aspartilglisil dizilerinin konformasyona uğraması ile pentadekapeptid (98-1112) adı verilen antibakteriyel ajanın sentezlendiği ve lizozimin antibakteriyel etkisini desteklediği ifade edilmiştir.

Akinbi vd. (2000), farelerin solunum epitel hücrelerinde savunma mekanizması olarak üretilen lizozimin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococla* karşı öldürücü etkisini gözlemlemek istemişlerdir. Bu amaçla, solunum epitel hücrelerinde, lizozim tamamlayıcı deoksi ribo nükleik asit (cDNA) genini lizozim enzimine dönüştürebilen 5 haftalık yavru transgenik farelerden faydalanmışlardır. Bu farelerdeki

bronkoalveolar sıvısındaki lizozim üretimini vahşi tip fareler ile kıyaslamışlardır. Transgenik farelerden bir kısmı 10^7 koloni oluşturan ünite (CFU) *Pseudomonas aeruginosa*, bir kısmı da 10^6 CFU B grup Streptecoc ile enfekte edilmiş ve savunma mekanizması tarafından üretilen lizozim miktarı takip edilmiştir. Streptecoc aşılانmış transgenik farelerde aşılamadan 6 saat sonra savunma mekanizması olarak lizozim üretiminin 2-3 kat arttığını, *Pseudomonas aeruginosa* aşılانmış transgenik farelerde ise aşılamadan 24 saat sonra lizozim üretiminin 5-30 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak *Pseudomonas aeruginosa* aşılانan vahşi tip farelerin %20'sinin öldüğünü, fakat *Pseudomonas aeruginosa* aşılانan tüm transgenik farelerin lizozimin antibakteriyel etkisi nedeniyle hayatta kaldığını belirtmişlerdir.

Kılıç vd. (2021), abiyotik yüzeylerdeki *Anoxybacillus rupiensis* kaynaklı biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik çalışmalarında lizozimin %77 oranında biyofilm kütlesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Chen ve Stewart (2000), atık su arıtma tesisinde paslanmaz çelik reaktör üzerinde *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'den oluşan 10^8 cfu'luk karışık flora tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını, litrede 500 mg lizozim içeren çözelti ile muamele ederek ortalama biyofilm giderimini %40, canlı hücre sayılarındaki azalma oranını %87 olarak tespit etmişlerdir.

Hukiç vd. (2018), aralarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın da bulunduğu dört farklı mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneği üzerinde lizozimin farklı konsantrasyonlarda antibiyofilm özelliğini *in vitro* koşullarda test tüpü yöntemi ile incelemiş ve sonuçta 30 µg/ml enzim konsantrasyonunda *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm hacminde %50 azalma olduğunu gözlemlemişlerdir.

Eladawy vd. (2020), *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dan oluşan klinik izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerini, doku kültürü tekniğine göre farklı konsantrasyonlarda lizozim ve proteinaz K'ya karşı gözlemlemişlerdir. 30 µg/ml konsantrasyonda lizozimin, proteinaz K'ya göre daha etkili olmak kaydıyla, *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmalarını %19 inhibisyon oranı ile azalttığını tespit etmişlerdir.

Pseudomonas aeruginosa'ya karşı kullanılan antibakteriyel ajanlardan biri de gümüş metalidir. Altın ve bakır gibi metallerde de antibakteriyel etkinin gözlemlendiği çalışmalar yapılmış fakat sonuçta en geniş spektrumda antibakteriyel etkiyi gümüş metali göstermiştir (Sreekanth vd., 2015; Supraja vd., 2018; Thekkae Padil ve Cernik, 2013).

Maki vd. (1988), bakterisidal gümüş emdirilmiş kollojen manşeti kataterlerin vücuda giriş noktasındaki deri altına yerleştirmiş ve bu sayede, gümüş emdirilmemiş kontrol kataterlerine göre manşetin yerleştirildiği deri altı bölgesinde bakteri ve fungus kaynaklı kolonizasyonu büyük ölçüde düşürdüklerini gözlemlemişlerdir.

Eren ve Baran (2019), fıstık yaprağı özütünden tarım ilaçlarına ikame antimikrobiyal amaçlı kullanılmak üzere gümüş nanopartiküller sentezlemiş ve antimikrobiyal etkiyi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bakterilerine ve *Candida albicans* mayasına karşı gözlemlemişlerdir. Sonuçta sırası ile 0.041, 0.662 ve 0.165 µg/ml kadar düşük konsantrasyonlarda dahi belirgin antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir.

Köse vd. (2020), ortopedik cerrahide, bakterilerin yüksek antibiyotik dirençlerinin sonucu olarak kemik yıkımına sebep oldukları kronik ostoyemlitin tedavisinde gümüşün antibakteriyel etkisini gözlemleyici bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 24 adet tavşandan 10 mm.lik kemik alınmış ve tavşanlar *Staphylococcus aureus* ile enfekte edilerek 3 gruba ayrılmışlardır. İlk gruba vankomisin antibiyotiği emdirilmiş kemik çimentosu boncukları, ikinci gruba gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat boncukları ve üçüncü gruba saf kalsiyum fosfat boncukları ile çıkarılan kemiklerin yerine ikame kemikler üretilmiş ve verilmiştir. Çalışmalar sonucunda gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat bazlı kemikte, en iyi kemik büyümesi, enfeksiyonla güçlü mücadele, en az doku hasarı ve nihayetinde kronik osteomyeliti tedavi etme yeteneği gözlemlemişlerdir.

Bugüne kadar yapılan gümüş antimikrobiyal çalışmalarında, bakterilerden ziyade ökaryot canlıların uygulanan teknikler sonucu maruz kalacakları gümüş miktarı yani toksik maruziyet dozu endişe ve merak uyandırmış ve bu maksatla ortama geçen gümüş miktarı, çeşitli spektrofotometrik cihazlar ile test edilmiştir.

Echegoyen ve Nerin (2013), üç farklı nanogümüş gıda ambalajından, gıda benzeri çözeltiye geçen nanogümüş miktarını migrasyon testleri ile incelemiştir. Sonuçta 40 °C’de 10 günlük ve 70 °C’de 2 günlük sürelerde dahi tespit edilen toplam migrasyon değerlerini, Avrupa Birliği (AB) yönetmeliğindeki izin verilen kişi başına maruziyet sınırının (0.05 mg Ag/kg gıda) altında bulmuştur.

Marchiore vd. (2017), tavuk sosislerini gümüş nanopartikül (AgNP) ile kaplamış ve laktik asit bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi ile gümüş iyonu (Ag^+) migrasyon miktarlarını ölçmüşlerdir. 30 günlük depolama süreci sonunda hem laktik asit bakterilerine karşı anlamlı bir antibakteriyel etki elde etmişler hem de depolama sonrası sosislerdeki toplam Ag^+ miktarını 5.3 ng/g olarak tespit etmişlerdir.

Braun vd. (2021), gümüş fosfat cam içeren polietilen tereftalat (PET) ambalaj metaryelinde, gümüşün sıvı gıdalardaki antimikrobiyal etkisi ve yasalarda izin verilen gümüş migrasyon sınırlarının aşıp aşılmadığını gözlemledikleri çalışmada, 21 ve 43 °C’lik depolama koşullarında, buzlu çay ve saf su ortamlarını kullanmışlardır. Çalışmalar sonucunda; gıda ortamının asidik ya da bazik karakterinin yanı sıra depolama sıcaklığının da gümüş iyon salınımı üzerinde etkili olduğu, artan asitlik ve sıcaklık değerlerinde daha fazla migrasyon gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ancak 21 °C’lik ve 43 °C’lik her iki depolama sıcaklığında dahi yasalarda izin verilen gümüş migrasyon sınırının aşılmadığını belirtmişlerdir.

Gümüşün, gümüş anot tekniği ile iyonlaştırılması sonucu antibakteriyel etkinin artması çeşitli sektörlerde spesifik bakterilere karşı antibakteriyel / antibiyofilm çalışmalarını da beraberinde getirmiştir.

Çibik ve Duran (2022), çiğ sütte *Pseudomonas* spp., Koliform ve laktik asit bakterilerine karşı 5 μA şiddetinde ve 20 dk süre ile gümüş anot tekniği uygulamışlar ve bu sütleri 5 °C, 10 °C ve 25 °C’lik ortamlarda ve 0, 12, 24, 36 saat süre ile muhafaza ederek antibakteriyel etki kontrolü yapmışlardır. Gümüş anot tekniği ile iyonlaşarak ortama yayılan gümüş iyonları sayesinde artan depolama süre ve sıcaklığına karşı *Pseudomonas* spp.’de kontrol grubuna göre 1.39 log kob/mL azalma, Koliform grubu bakterilerde 1.82 log kob/mL azalma, laktik asit bakterilerinde ise 0.46 log kob/ mL azalma gözlemlemişlerdir.

Aydın (1997), diş apselerinde gümüş anot tedavisinin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkisini gözlemlemek amacı ile yapmış olduğu bir dizi çalışmada uygulanan elektrik akımını, doğru akım ve kare akım şeklinde uyguladığında oluşan etki mekanizmasını tanımlamıştır. Buna göre kare dalga elektrik akımında oluşan gümüş iyonlarının daha uzak mesafelere ulaşabildiğini fakat antibakteriyel etkinin zayıf şekilde gözlemlendiğini, ancak doğru akım uygulandığında oluşan gümüş iyonlarının daha kısa mesafelerde emülsifiye olduklarını fakat antibakteriyel etkinin daha fazla gözlemlendiğini belirtmiştir.

Young vd. (1994), kronik yara iyileşmelerini desteklemek amacı ile kullanılan gümüş elektrotların, patojenlerin büyümesini engellemesinde ortam pH değeri, uygulanan akımın genliği gibi faktörlerin etkilerini tespit etmek için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada; 26-800 μA arası uygulanan akımların, akım genliği ve ortam pH değerinden etkilenmeyerek, gümüş anot çevresinde, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı güçlü inhibisyon zonlarının oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Mahmoud ve El-Liethy (2022), atık suların Ag ile modifiye edilmiş karbon keçe elektrotlar ile arıtılmasında gümüş elektrotların ve salınan gümüş iyonlarının farklı akış hızlarında ve akım yoğunluklarında antibakteriyel etkisini gözlemlemişlerdir. 104 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 'lik akım uygulandığında *E.coli*, *Salmonella* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da yaklaşık 2 log değerinde bakteriyel azalma gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Kalishwaralal vd. (2010), kontakt lenslere ve buradan da göze biyofilmler aracılığı ile bulaşan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus epidermidis*'in neden olduğu mikrobiyel keratit hastalığının öncül tedavisinde biyofilmlerin, biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller ile giderilmesine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Sonuçta 2 saatlik muamele boyunca 100 nM'lık gümüş nanopartikül konsantrasyonunda biyofilm oluşumu için önem arz eden ekzopolisakkarit yapının *Pseudomonas aeruginosa*'da %95, *Staphylococcus epidermidis*'de ise %98 oranında engellendiğini gözlemlemişlerdir.

Dusane vd. (2008), yaralarda *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı oluşan biyofilmlerin önlenmesi için gümüş elektrotlara 1 k Ω 'luk dirençle 6 V'luk doğru

akımı 24 saat boyunca uygulamıştır. Uygulama sonunda anot üzerinde biyofilm kaybı ve canlı hücrelerde 4 log'luk bir azalma sağlandığını, taramalı elektron mikroskopunda hasarlı hücrelerin ve bozulmuş biyofilm yapılarının gözlendiğini bildirmişlerdir. Hatta antimikrobiyal aktivitenin, akım kapatıldıktan sonra bile en az 2 gün boyunca devam ettiğini belirtmişlerdir.

Mevcut literatür bilgileri ışığında gümüş anot tekniğinin gıda sektöründeki antibakteriyel etki çalışmaları yok denilecek kadar azdır. Gümüşün gıdalar üzerindeki antibakteriyel etkisi yönündeki çalışmaların, bakteriler ve geniş ortam koşulları göz önüne alındığında yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu sebepten ötürü çiğ sütte lizozim enzimi ve gümüş anot tekniğinin *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilmi üzerindeki etkilerini gözlemlediğimiz çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3. METARYAL ve YÖNTEM

Çalışmalarda, *Pseudomonas aeruginosa* suşunun canlandırılması ve doğrulama testleri, Mc Farland standartlarının hazırlanması, lizozim enziminin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerinin tespiti, gümüş anot tekniğinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın inhibisyonu için uygun akım ve sürenin belirlenmesi, sütün kimyasal analizleri Aksaray Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Süt ve Süt Ürünleri Kimyasal / Mikrobiyoloji Analiz Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma desenlerine uygulamaların yapılması, antibakteriyel etki için mikrobiyolojik ekimlerin yapılması ve değerlendirilmesi, biyofilm analizi ise Aksaray Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan çiğ süt Aksaray İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'nden temin edilmiş, soğuk zincir kurallarına riayet edilerek hızla laboratuvara ulaştırılmış ve çalışma başlayana kadar soğukta muhafaza edilmiştir. Çalışmalara başlamadan önce çiğ sütün yağ, protein, toplam kuru madde, pH, titre edilebilir asitlik ve sıcaklık derecelerinin ölçümleri yapılmıştır. Sıcaklık ölçümleri infrared termometre (LYK DARK, Türkiye) ile yapılmıştır.

3.1. Mc Farland Standartlarının Hazırlanması

Mc Farland bulanıklık standartları, Joseph Mc Farland tarafından bakteriyel çalışmalarda bakteri süspansiyonlarının belirli ve standart sayılarda olmasını sağlamak amacıyla 1907 yılında tanımlanan, baryum klorit ve sülfirik asitin belirli oranlarda karşılaştırılması ile elde edilen, baryum sülfatın farklı konsantrasyonlardaki bulanıklıklarının karşılık geldiği bakteri sayısının esas alındığı standartlardır. Standarttaki en düşük volüm 0.5, en yüksek volüm ise 10 değerine sahiptir. Özellikle antibiyotik duyarlılık testlerinde sıklıkla kullanılan standart olan 0.5 no Mc Farland standardı 1.5×10^8 koloni oluşturan birim (kob)/ml kadar bakteri varlığını ifade etmektedir. Karşılaştırılacak olan bakteri süspansiyonu ve kullanılacak Mc Farland standardı, karşılaştırma yapmadan önce vortex (WiseMix/WM-10, Korea) ile 1-2 dakika kadar karıştırılıp, yeterli ışık altında ve whatman kağıdına (üzerinde siyah yazılar veya çizgi şeklinde bantlar bulunan beyaz kağıda) yan yana tutularak karşılaştırma yapılmıştır. Standart; %1'lik Sülfirik Asit (H_2SO_4) (100731, MERCK) ile %1.175'lik Baryum Klorit ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) (101717, MERCK)'in belirli

oranlarda karıştırılması ile hazırlanmaktadır (Bollela vd., 1999; Koşarsoy, 2013; Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014).

3.1.1. %1'lik H₂SO₄ hazırlanması

100 ml ölçekli balon jojeye 90 ml saf su alınmış ve üzerine ticari, %95-97'lik H₂SO₄'ten 1 ml konularak saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.2. %1.175'lik BaCl₂.2H₂O hazırlanması

1.175 mg baryum klorit tartılmış ve 100 ml ölçekli balon jojeye aktarılmıştır. Önce 50 ml saf su eklenerek baryum kloritin erimesi sağlanmış, ardından balon hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

3.1.3. 0.5 no Mc Farland standardının hazırlanması

100 ml hacimdeki balona, daha önceden hazırlanmış olan 100 ml %1.175'lik baryum kloritten 0.5 ml alınır ve üzerine 99.5 ml %1'lik H₂SO₄ konulur. 0.5 Mc Farland standardı önce 100 ml'lik hacimde hazırlanıp sonra karşılaştırmada kolaylık sağlamak için 20 ml lik ağzı mantar tıpalı tüpe 10 ml hacim alınarak ortam sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan tüm standartların doğrulaması Mc Farland densitometresi cihazı (BIOSAN, DEN-1, 16 and 18 mm glass tubes) kullanılarak yapılmıştır.

3.2. *Pseudomonas aeruginosa* Bakterisine Karşı Lizozim İçin MIC Değerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan lizozim (MAYSA, Türkiye), yumurta akından elde edilmiş, toz formda ve ≥ 35000 U/mg $\pm$ %5 spesifik aktiviteye sahiptir. Lizozim enziminin *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı MIC deneyi Kirby Bauer yöntemine göre yapılmıştır (Bauer vd., 1966). Mueller-Hinton Agar (MHA) (105437, MERCK) besiyeri üzerine, hassas terazi (AND-HR-250AZ, Japonya) ile tartılıp farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lizozim dilüsyonunun emdirildiği boş antimikrobiyal duyarlılık test diskleri (BIOANALYSE, Türkiye) yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları dijital kumpas (SHOWA-Dıgımatic, 150 mm'lik) ile ölçülmüştür.

3.3. Gümüş Anot Düzeneginin Oluşturulması

3.3.1. Gümüş plakaların hazırlanması

Çalışmada kullanılan gümüşler %99.9 saflıkta, 10 gr ve 5 gr plakalar ve 15 gr saf boncuk şeklinde Nadir Gümüş'ten ambalajlı ve merkez bankası logolu olarak temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 10 gr ve 5gr olarak temin edilen paketli saf gümüşler.

15 gramlık saf boncuklar, Aksaray ilinde faaliyet gösteren Gözgülü Gümüş işletmesinde saflık değeri bozulmadan plakaların üzerine, (çalışmalarda standart 9 cm çapa sahip cam petri kabı kullanılacağı için) 8 mm yükseklikte ve 3 cm uzunlukta sap olarak kalıplandırılmış ve işlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Gümüş plakaların saplarının kalıplanmış ve plakaya işlenmiş hali.

Bu sayede plakaların, 1.5 cm yüksekliğe sahip olan petri kabının tabanına değmesi engellenmiş ve oluşturulan akımda en geniş gümüş yüzey alanı sağlanması hedeflenmiştir (Şekil 3.3). 10 g'lık, anotta kullanılacak olan gümüş plakanın eni 15 mm, boyu 25 mm, yüksekliği 3 mm, 5 g'lık katotta kullanılacak olan gümüş plakanın eni 14 mm, boyu 23 mm, yüksekliği ise 1.5 mm olarak bırakılmıştır.



Şekil 3.3. Gümüş anot plakalarının petri kabına yerleştirilmiş pozisyonu.

Hazırlanan gümüş plakalar başlangıçta yüzeyinde kaba kir, gress yağı vb. olma durumu göz önüne alınarak temizlenmesi için bir gece asetonda bekletilmiş, deterjanla yıkanıp, durulanıp, saf sudan geçirilerek otoklavda (OT4060, NÜVE) 121°C'de 1 atm basınçta 15 dk. sterilize edilmiştir.

3.3.2. Gümüş anot düzeneği

Çalışma için tasarlanan gümüş plakalardan 10 g'lık olanı anot kutupta, 5 g'lık olanı ise katot kutupta kullanılmıştır. Polarlanmayı sağlayacak olan güç kaynağı olarak saat pili (1.5 Volt'luk) kullanılmıştır. İstenilen düzeyde mikroamper seviyelerinde akım, güç kaynağı olan pil ile kutuplar arasına bağlantısı yapılan potansiyometre (5 M Ω 'luk) ile sağlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 1.5 Volt' luk saat pili (solda), 5 MΩ' luk potansiyometre (sağda).

İletken kablonun kırmızı renkli anodu temsil eden kısmı saat pilinin artı kutbuna, katotu temsil eden siyah renkli kısmı ise saat pilinin eksi kutbuna bant ile iyice sabitlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mavi bant içine sabitlenmiş saat pili, potansiyometre, iletken kısıkaçlar ve gümüş plakalar düzeneği.

Saniyede geçen 6.241509×10^{18} kadar elektrik yükü Amper olarak adlandırılır ve Uluslararası Birim Sistemi (SI)'nde "A" ile simgelenir. Ohm yasasına göre iletken bir telden geçen elektrik akımı (amper) ile bu akımın devreye uyguladığı ve elektron akışını tetikleyen basınç yani gerilim (volt) doğru orantılıdır. İletken telin uzunluğuna ve türüne bağlı olarak akıma karşı gösterdiği tepki ise direnç (Ohm) olarak tanımlanmıştır. Akım ile direnç arasında ters orantı vardır. Buna göre Ohm kanunu Eşitlik (3.1.)'deki;

$$I = V \div R \quad (3.1)$$

denklemleri ile akımın şiddetinin hesaplanacağını göstermektedir (Arifović ve Turhan, 2019).

Çalışmalar esnasında pilin volt değeri avometre (UNI-T/UT50C, China) ile ölçülüp, istenilen akım seviyesine kadar ihtiyaç duyulan direnç değeri hesaplanmış ve ayarlama için potansiyometre, avometreye bağlantı yapılarak hesaplanan direnç değerine sabitlenmiştir.

3.3.3.Uygun akım ve sürenin belirlenmesi

Gümüşün 20 μA 'lık akımdan fazla akım ve süre ile polarlanması antibakteriyel etkide arttırıcı ya da azaltıcı nitelikte bir değişikliğe yol açmadığı daha önceden yapılan pek çok çalışmada literatürde yer almaktadır. Daha çok tıp sektöründe yer alan çalışmalarda; bir dizi kompleks reaksiyonlara yol açmaması için canlı dokuya uygulanabilecek akımın en fazla 20 μA seviyelerinde olması gerektiğinde hem fikir olunmuş, 20 μA 'den daha fazla uygulanan akımlarda gümüş iyon salınımının ve gözlenen antibakteriyel etkinin değişmediği belirtilmiştir. Ayrıca 5 μA 'den daha düşük akımların da yetersiz antibakteriyel etkiye neden olduğu tespit edilmiştir (Aydın, 1997; Aydın, 1997). Bu tespitten yola çıkılarak uygulamada; antibakteriyel etkinin gözlemleneceği metaryalin canlılar tarafından tüketilen çiğ süt olması ve 20 μA 'den fazla akımlarda antibakteriyel etkide artış olmaması gerekçesi ile başlangıç aşamasında 5-20 μA arası akımın *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi için en güçlü antibakteriyel etkiyi oluşturacağı tek akım düzeyi tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; çiğ sütün işletme hatlarından minimum sürede geçtiği proses olan, borulardan geçiş süresi ve enstrümantel analiz cihazlarındaki optimum analiz süreleri baz alınarak 15-30-45 ve 60 saniyeden oluşan sürelerde, 5-20 μA arasında yer alan 5-10-15-20 μA lık dört çeşit akımın, *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkisi, koloni ekim yöntemine göre gözlemlenmeye çalışılmıştır.

3.4. Uygulama Desenleri

Çalışmada lizozim ve gümüş anot tekniğinin farklı kombinasyonlarının, çiğ sütün doğal florasında bulunan *Pseudomonas aeruginosa*'ya ve çiğ süte inoküle edilen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna olan antibiyofilm ve antibakteriyel etkilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışma deseni sadece çiğ süttten oluşan kontrol grubunun da yer aldığı 8 farklı biçimde oluşturulmuştur. Desenler K, K1, K2, K3, K4, K5, K6 ve K7 olarak kodlanmıştır. Desen içerikleri Çizelge 3.1' de tarif edilmiştir.

Çizelge 3.1. Uygulama desenleri ve içerikleri.

Desen Kodu	Desen İçeriği
K (Kontrol)	40 ml çiğ süt
K1 (Kontrol)	39 ml çiğ süt + 1 ml 0.5 Mc Farland <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
K2	40ml çiğ süt + Lizozim enzimi
K3	39 ml çiğ süt + Lizozim enzimi + 1 ml 0.5 Mc Farland <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
K4	40 ml çiğ süt + Gümüş anot tekniği

Çizelge 3.1 (devam). Uygulama desenleri ve içerikleri.

K5	39 ml çiğ süt + 1 ml 0.5 Mc Farland <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Gümüş anot tekniği
K6	39 ml çiğ süt + 1 ml 0.5 Mc Farland <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Lizozim enzimi + Gümüş anot tekniği
K7	40 ml çiğ süt + Lizozim enzimi + Gümüş anot tekniği

3.5. Mikrobiyolojik Analizler

Çalışmalarda, Aksaray Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen saf *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. %20'lik gliserolde bulunan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunu aktive etmesi, 10 ml Tryptic Soy Broth (TSB) (105459, SIGMA, Kanada) besiyeri kullanılarak yapılmıştır.

%0.5'lik tetra metil-p-fenilen di amin (193992, SİGMA-Aldrich) ayırıcı ile kırmızı-mavi renk oluşması ile oskidaz pozitif testi ve sadece *Pseudomonas aeruginosa*'ya mahsus olan, 10 ml/L gliserol (TEKKİM, Türkiye, %99.5'lik) ilave edilmiş Cetrimide Agar (CA) (105284, MERCK, Almanya) besiyerinde, 42 °C'de üreme testi ile de identifikasyonu yapılmıştır (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014).

Pseudomonas aeruginosa ekimleri CA üzerine yayma yöntemine göre, 9 ml steril %0.9'luk sodyum klorid (NaCl) (6400, MERCK, Almanya) içinde 10^{-4} dilüsyona kadar yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Brown ve Lowbury, 1965; Mossel ve Indacochea, 1971). İnkübasyon sonunda koloni sayımları yapılmış ve $\log_{10}$ dönüşümüne göre kob/ml olarak hesaplanmıştır.

3.6. Kimyasal Analizler

Süt yağı, toplam kuru madde ve protein analizleri için harici olarak yeterli miktarda çiğ süt numunesi temin edilmiş, süt yağı ve toplam kuru madde analizleri AOAC yöntemi ile (AOAC 2005), protein analizi ise Kjeldahl yöntemine göre (AOAC 2005; yöntem 991.20), 6.38 düzeltme faktörü kullanılarak hesaplanmıştır. Titre edilebilir asitlik değeri ise Soxhalet Henkel yöntemine göre (AOAC 2005) tespit edilmiş, % laktik asit dönüştürme faktörü (0.0225) ile çarpılarak dönüşümü yapılmıştır. pH ölçümü WTW 3110 (Weilheim, Almanya) model el pH metresi ile yapılmıştır. Her parametre 3 paralelli tekrarlanmıştır.

3.7. Biyofilm Analizi

Biyofilm analizinde yapışık olmayan, zayıf veya orta düzeyde biyofilm üreten bazı klinik izolatlarla karşı yüksek duyarlılık göstermesinden dolayı (Eladawy vd., 2020; Turgut, 2016; URL-10) 96 kuyucuklu mikropate yönteminin kullanılması tercih edilmiştir.

Çalışmanın biyofilm analizi O'Toole (2011)'un, mikrotiter kuyucuklarda biyofilm oluşumu test tekniğine göre yapılmıştır. Buna göre 96 kuyucuklu U tabanlı mikrotiter plaklarda, absorbans yoğunluğuna göre elisa okuyucuda (CHROMATE, Romerlabs) (Şekil 3.6), 630 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Buna göre mikropalak hücrelerine %1 glikoz monohidrat (108342, MERCK) içeren TSB (TSB_G) sıvı besiyeri konulup, 3'er paralelli olacak şekilde, çalışmanın her deseninden ekim yapılmış, mikropalakların kapağı kapatılmış ve 37 °C'de 24 saat etüvde (ŞİMŞEK, Laborteknik) inkübasyona bırakılmıştır. TSB besiyerine %1 oranında glikoz katılmasının, diğer sıvı besiyeri ortamlarına göre *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu fazlaca arttırdığı belirtilmiştir (Eladawy vd., 2020).



Şekil 3.6. Spektrofotometrik eliza test cihazı.

İnkübasyonu tamamlanan plakların içi yavaşça dökülmüş ve her kuyucuk 3 kez 200 μ l steril Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (SIGMA-Aldrich, pH 7.4) ile hafifçe yıkanmış ve ters çevrilerek ortamda 30 dk kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, her kuyuya 200 μ l %99'luk metanol (106012, MERCK) ilave edilerek kuyucuk çeperlerine bağlanmış bakteriler fikse edilmiştir. 15 dk metanol ile bekledikten sonra steril saf su ile hafifçe 3 kez yıkanan kuyucuklar 30 dk boyunca tekrar ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kuyucuklar 200 μ l, %0.5 (w/v)'lik kristal viyole (80H0541, SIGMA CHEMICAL, USA) ile 5 dk boyanmıştır. Plaklar hafifçe ters çevrilerek fazla boya uzaklaştırılmış ve plaklar steril saf su ile 3 kez tekrar yıkanmıştır. 30 dk ortamda kurutulduktan sonra kuyu başına 200 μ l %33'lük asetik asit (BİRPA, Türkiye, %99'luk) ile boyanan yapışmış biyofilm tabakaları çözündürülüp spektrofotometrik olarak eliza okuyucuda 630 nm de absorbans değerleri ölçülmüştür (Al-Khazraji ve Al-Maeni, 2021).

3.7.1. %33 (v/v)'lük asetik asit hazırlanması

100 ml %33 (v/v)'lük asetik asit hazırlamak için; 100 ml'lik balon jojeye glasiyel asetik asitten (%99 saflıkta) 32.67 ml alınır ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.7.2. %0.5'lik kristal viyole hazırlanması

0.5 g kristal viyole, 100 ml %70'lik etil alkolde çözündürülmüştür.

3.7.3. %70'lik etil alkol hazırlanması

Mevcut %96'lık etil alkolden pearson karesi hesabına göre hazırlanmıştır. Buna göre; %96'lık etil alkolden 70 ml alıp üzerine 26 ml saf su eklendiğinde 96 ml hacimde %70'lik etil alkol elde edilir. 96 ml'lik toplam hacmin 70 ml'si %96 lık etil alkolden oluşuyorsa, 100 ml'lik toplam hacimde ise 72.92 ml %96'lık etil alkol bulunur. Geriye kalan 27.08 ml'lik hacim ise saf su ile tamamlanır.

3.7.4. Biyofilm oluşumunun yorumlanması

Çalışmanın her deseninin, eliza cihazında 630 nm'de absorbans değeri ölçülmüş ve 3'er paralelli olan her kuyucuğun değerlerinin ortalaması alınmıştır. Sadece besiyeri içeren negatif kontrol kuyucuklarının önce aritmetik ortalaması ve daha sonrada standart sapma (SD) değeri bulunmuştur. Sınır değer ($OD_{cut\ off}$) olarak; negatif kontrol kuyucuklarının ortalama absorbans değeri (OD_{ort}) + (2* SD) değeri bulunmuş ve Çizelge 3.2'de bulunan tabloda hesaba dâhil edilmiştir.

Çizelge 3.2. Biyofilm sonuçlarının yorumlanmasında faydalanılacak olan semi kantitatif skala (Başaran, 2019).

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

Ayrıca desenler arası biyofilm oluşumunun ne oranda azaldığı, % biyofilm hesabına göre Eşitlik (3.2)'deki

$$\%(biyofilm) = 100 \times (OD_{son} - OD_{ilk}) / OD_{ilk} \quad (3.2)$$

formülü ile hesaplanıp, yorumlanmıştır/karşılaştırılmıştır (Turgut, 2016).

3.8. Süte Geçen Ag⁺ Miktarının Tayini

Uygulamanın yapıldığı sütlerin dışında harici olarak petri kabına 40 ml süt alınmış, gümüş plakalar yerleştirilmiş ve 20 μ A' lik akım 1 dakika boyunca uygulanmıştır. Süte geçen gümüş iyonlarının miktarının tayini için eser miktardaki elementleri tayin etme olanağı sağlayan İndüktif Olarak eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrofotometresi (ICP-MS) tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte örnekler 10000 K sıcaklıktaki bir argon plazmaya gönderilerek iyonlarına ayrıştırılmaktadır. İyonize elementler kütle spektrofotometresi tarafından sınıflandırılarak, element derişimleri, elektron çoklayıcı tarafından ölçülmektedir (Hou ve Jones, 2000). Gümüş anot tekniği uygulanan çiğ süte, Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (ASUBTAM), ICP-MS (ThermoScientific-X Series 2) spektrofotometrisi ile Ag⁺ miktar tayini yapılmıştır. Analiz öncesinde süt numunesi mikrodalga kapalı sistem yaş yakma ünitesinde (CEM MARS5, Matthews-Kuzey Karolina) yakılarak çözündürülmüştür. Çözündürmede; 2'şer ml alınan 3 paralel süt numunelerine; 8 ml %65'lik konsantre Nitrik Asit (HNO₃) (Sigma-Aldrich) ve 1 ml %30'luk H₂O₂ (Sigma-Aldrich) eklenip 130 °C'de 10 dk, 150 °C'de 5 dk ve 180 °C'de 10 dk olmak kaydıyla 3 kademeli işlem uygulanmıştır. Çözündürülmüş ve soğumuş numuneler balon jojelere alınarak 50 ml ultra distile su (ELGA DV 25) ile seyreltilmiştir. Metal kontaminasyonunu engellemek için, tüm malzemeler HNO₃ (1:1) ve (1/9) oranında ultra distile sudan geçirilmiştir. Seyreltilen numuneler 25 / 0.45 μ m'lik filtreden (İsolab) süzölmüş ve analiz zamanına kadar +4 °C'de bekletilmiştir. ICP-MS cihazında analiz için sertifikalı standartlar kullanılmış ve analiz 3 paralel olarak yapılmıştır (Kan ve Küçükkurt, 2018).

3.9. İstatistiki Hesaplar

Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin inhibisyonu için uygulanan gümüş anot tekniğinde en uygun akım şiddeti ve sürenin tespit edilmesi için verilere önce varyans (anova) analizi yapılmış ve devamında Taguchi istatistik test metodu kullanılmıştır (Akgün ve Demir, 2020; Canıyılmaz ve Kutay, 2003; İç ve Yıldırım, 2012; Kıvak, 2014). Hesaplamalar, deneydeki tüm parametrelerin kullanıldığı L₁₆ orthogonal (dikey) dizine göre yapılmış, deney sonuçlarının değerlendirilmesinde (S)/(N) oranı esas alınmıştır.

Biyofilm analizinde absorbans sonuçlarının karşılaştırılması ve yorumlanmasında semi kantitatif skaladan ve % biyofilm değerlendirme orantısından faydalanılmıştır.

Lizozim ve gümüş anot tekniğinin çiğ sütteki antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılması için uygulama desenlerinin herbiri üç paralel çalışılmış ve elde edilen koloni sayıları SPSS 22.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Önemli çıkan varyasyon kaynaklarının ortalamaları Duncan çoklu karşılaştırma testiyle karşılaştırılmış ve istatistiki analiz sonuçları değerlendirilmiştir (Snedecor & Cochran, 1980). Önem seviyesi $p<0.05$ olarak alınmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Kimyasal Analiz Sonuçları

Çiğ sütün kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Çiğ sütün kimyasal parametre analiz sonuçları.

% Yağ	3.94±0.02
% Protein	3.60±0.03
% Toplam Kurumadde	12.78±0.04
% Laktik asit	0.140±0.01
pH	6.69±0.01
Sıcaklık (°C)	8

Türk Standardı (TS) 1018 çiğ süt standardına göre çiğ inek sütü kendine has koku, tat, renk ve kıvamda olmalı, kimyasal özellikleri açısından yağ değeri % (m/v) cinsinden en az 3.5, protein değeri % (m/v) cinsinden en az 2.8 olmalıdır. Asitlik derecesi süt asidi cinsinden % (m/v) esasına göre en az 0.135, en fazla 0.200 olmalıdır (TSE 1018, 2002). Çalışmamızda kullandığımız çiğ sütün kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde TS 1018 çiğ süt standardına uygun olduğu görülmektedir.

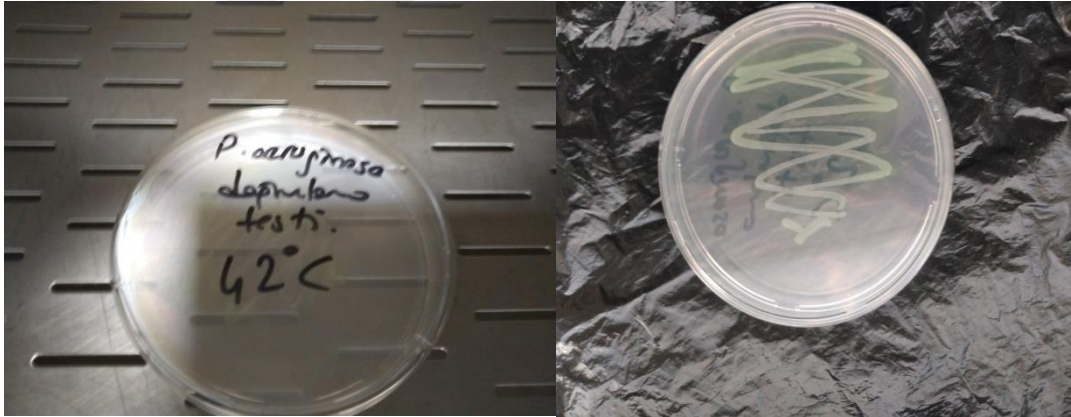
4.2. *Pseudomonas aeruginosa*’nın Aktifleştirilmesi ve Doğrulama Testleri

%20’lik gliserolde bulunan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşundan steril koşullarda bir öze alınıp, otoklavda 121 °C’de 1 atm. basınçta 15 dk. sterilize edilmiş olan 10 ml TSB besiyerinde, 37 °C’de 24 saat aktifleştirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. TSB içinde *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun aktifleştirilmesi, solda inoküle tüp ve sağda şahit tüp.

Aktifleşen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu oksidaz pozitif (+) ve spesifik 42 °C’de üreme kontrolüne göre doğrulama testleri yapılmıştır (Şekil 4.2) (Maçin, 2014; Terzi, 2012).



Şekil 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*’nın 42 °C’de üremesi.

4.3. *Pseudomonas aeruginosa*’nın 0.5 Mc Farland Standardına Ayarlanması

Bakteri konsantrasyonunun ayarlanması için kullanılacak olan Mc Farland Standart çözeltileri; %1’lik Sülfirik Asit ile %1.175’lik Baryum Klorit’in Çizelge 4.2’de belirlenen hacimlerde karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Çizelge 4.2. Mc Farland standartlarının numarası ve %1’lik H_2SO_4 ile %1,175’lik $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ kullanım oranları (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014).

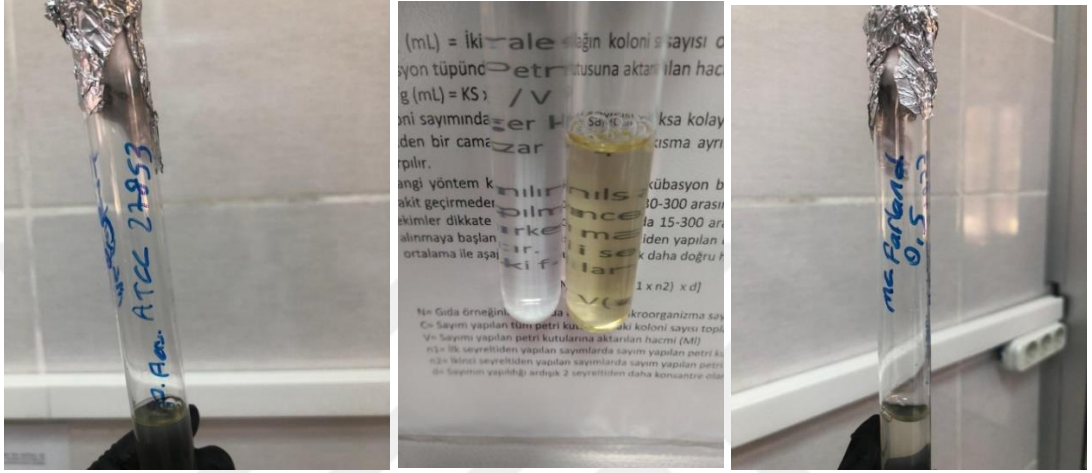
Standart numarası	Hacim (mL)		Bakteri sayısı ($\times 10^8$)/mL
	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (%1.175)	H_2SO_4 (%1)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Belirtilen oranlarda, hassas bir şekilde hazırlanan Mc Farland standart serisinin her üyesi 2’şer dakika vortexlendikten sonra densitometre ile doğrulamaları yapılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Hazırlanan Mc Farland bulanıklık standartlarının densitometre ile doğrulanması.

Aktifleştirilen ve doğrulama testleri yapılmış olan *Pseudomonas aeruginosa*, daha önceden %0.9'luk oranda hazırlanıp, otoklavda, 121 °C'de 1 atm basınçta 15 dk sterilize edilmiş 10 ml NaCl içine, 0.5 nolu Mc Farland standardına göre ml'de yaklaşık 1.5×10^8 bakteri olacak şekilde ayarlanmıştır. Bulanıklık testi şahit iki kişinin gözleminde, ışık altında, tüplerin arkasına beyaz zemine siyah yazılı kâğıt tutularak yapılmıştır (Şekil 4.4) (Tekin, 2010).



Şekil 4.4. TSB' da aktifleştirilmiş *Pseudomonas aeruginosa*'nın (en solda), 10 ml %0.9' luk NaCl içinde 0.5 no Mc Farland bulanıklık standardına ayarlanması (ortada). 0.5 Mc Farland ayarlaması yapılmış *Pseudomonas aeruginosa* 27853 suşu (En sağda).

4.4. *Pseudomonas aeruginosa* Bakterisine Karşı Lizozim İçin MIC Değerinin Tespiti

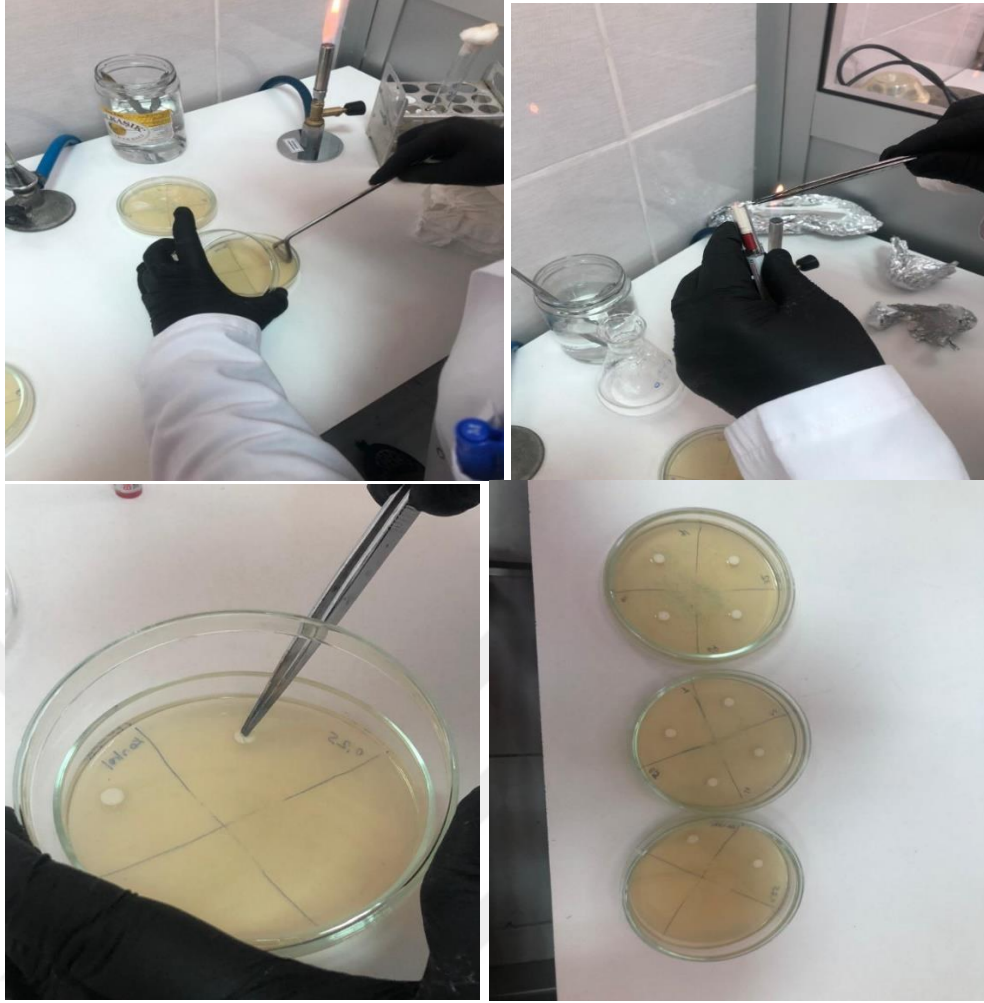
Bunun için stok olarak 100 ml, seyreltme solüsyonları olarak da 50' şer ml' den oluşan 10 adet, %0.9' luk NaCl dilüsyonu hazırlanmış, otoklavda 121°C' de 15 dk sterilize edilip soğutulmuştur.

MIC için lizozim konsantrasyonları olarak %0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 mg lizozim içeren konsantrasyonlar seçilmiştir. Önce 100 ml, %0.9'luk NaCl içinde 64 mg lizozim çözündürülmüş ve stok dilüsyon olarak hazırlanmıştır. Stokdan alınan 50 ml, diğer 50 ml NaCl içeren erlene aktarılmış ve böylece 32 mg lizozim içeren 100 ml'lik dilüsyon elde edilmiştir. Bu şekilde seyreltmelere devam edilerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (Şekil 4.5).



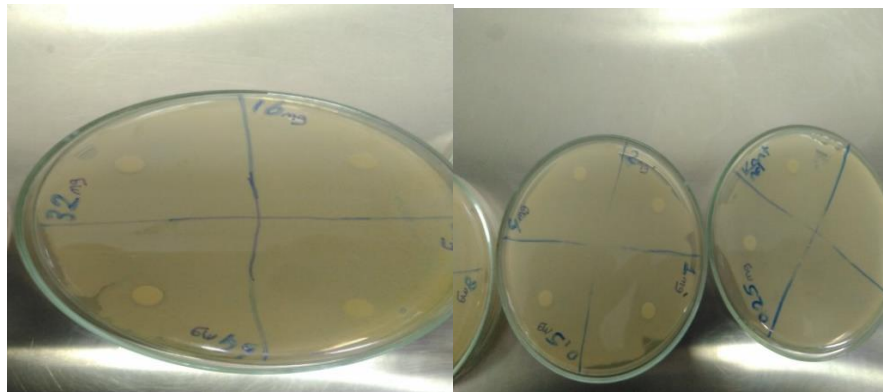
Şekil 4.5. Lizozim konsantrasyonları.

Kirby Bauer yöntemine göre; 3 adet steril cam petri kabına 5-6 mm kalınlığında MHA besiyerine dökülmüş ve ağzı kapalı soğumaya bırakılmıştır. Daha önceden 0.5 Mc Farland bulanıklık standardına ayarlanmış olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sıvı süspansiyonu, 100 μ L hacimde alınarak soğuyan MHA besiyerinin yüzeyine, alkolde bekletilip alevden geçirilmiş drigalski spatülü ile yayılmış, petrinin kapağı kapatılmış ve 15 dk kuruması için beklenmiştir. Daha sonra boş antimikrobiyal duyarlılık test disklerine alevden geçirilmiş pens ile ilgili lizozim dilüsyonları emdirilip, çıkarılarak MHA yüzeyindeki ilgili bölümlere yerleştirilip, hafifçe bastırılmıştır. 15 dakikada tamamlanan bu işlemten sonra besiyerleri 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kirby Bauer yöntemine göre disk difüzyon testinin uygulanışı.

İnkübasyon sonunda bu konsantrasyonlardaki lizozim enziminin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerinde inhibisyon etkisi yapmadığı gözlemlenmiş (Şekil 4.7) ve yeniden daha yüksek konsantrasyonda lizozimin hesabı yapıp hazırlıklarına başlanmıştır.



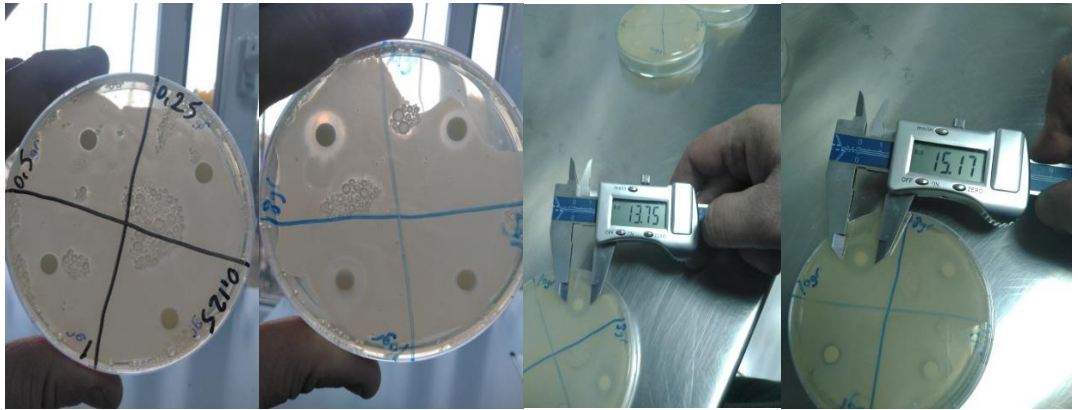
Şekil 4.7. İnkübasyon sonunda oluşmayan inhibisyon zonları.

Yeniden belirlenecek olunan konsantrasyonlarda mevcut çalışmanın en yüksek konsantrasyonunun iki katları alınacak şekilde dilüsyon oranlarına riayet edilmiştir. Buna göre yeni konsantrasyonlar 0.125, 0.250, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 g/100 ml olarak, yine %0.9'luk NaCl içine stoktan seyreltme yoluyla hazırlanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Hazırlanan yeni lizozim konsantrasyonları.

Kirby Bauer yöntemine göre tekrar aynı çalışmalar yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zon çapları dijital kumpas ile ölçülmüş (Şekil 4.9) ve 6 mm'lik disk çapının iki katını geçen zonların en seyreltik olanı, enzimin minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak yorumlanmıştır (Abbasoğlu, 1996).



Şekil 4.9. İnkübasyon sonunda oluşan zonlar ve kumpas ile çap ölçümleri.

Çizelge 4.3'de çalışmada kullanılan tüm lizozim konsantrasyonları ve zon çapları belirtilmiştir. Lizozim konsantrasyonu 1 ile belirtilen sütunda mg seviyesinde hazırlanan ve sonucunda yeterli zon oluşumu gözlenmeyen konsantrasyonlar, lizozim

konsantrasyonu 2 ile belirtilen sütunda ise inhibisyonun gözleendiği gram seviyesindeki konsantrasyonlar listelenmiştir.

Çizelge 4.3. MIC testi sonucu ölçülen zon çapları (değerlere 6 mm lik disk çapı dahildir).

Lizozim konsantrasyonu 1 (mg/100ml)	Ölçülen zon çapı(mm)	Lizozim konsantrasyonu 2 (g/100ml)	Ölçülen zon çapı(mm)
0 (kontrol)	Zon yok	0.125	7.02 ± 0.01mm
0.25	Zon yok	0.250	7.06 ± 0.00 mm
0.5	Zon yok	0.5	7.28 ± 0.01mm
1	Zon yok	1	7.23 ± 0.01 mm
2	Zon yok	2	7.57 ± 0.05 mm
4	Zon yok	4	9.53 ± 0.07mm
8	6.93 ± 0.01 mm	8	12.23 ± 0.12mm
16	6.95 ± 0.01mm	16	14.46 ± 0.71 mm
32	6.97 ± 0.00 mm		
64	7.01 ± 0.00 mm		

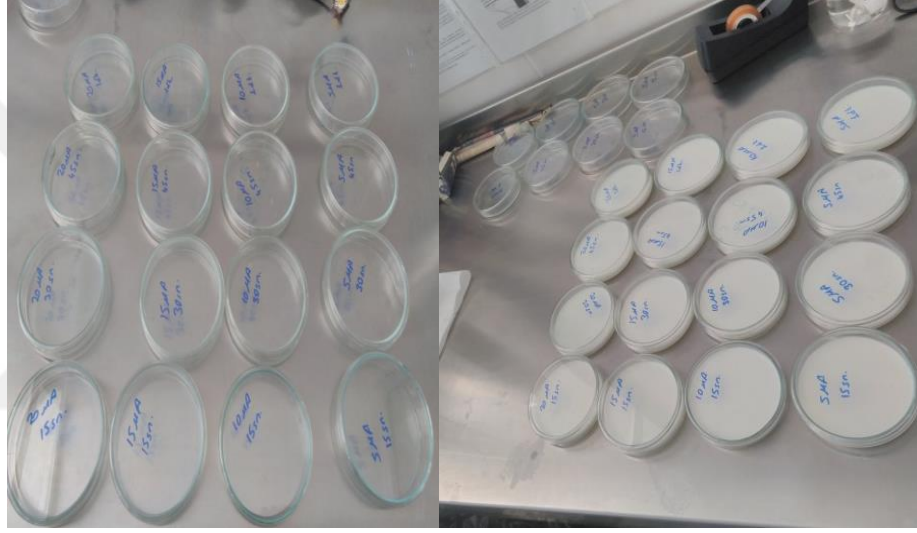
Yapılan çalışmada minimum inhibisyon dilüsyonu olarak 6 mm'lik disk çapının iki katını geçen en seyreltik konsantrasyon olan 8 g/100 ml'lik konsantrasyon tespit edilmiştir. Tespiti yapılan lizozim konsantrasyonu uygulamada 40 ml'lik süt miktarına % orantı hesabı ile katılmıştır. Buna göre 40 ml'lik çiğ süte 3.2 g tartılmıştır.

4.5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 İlaveli Çiğ Sütte Uygulanacak Olan Akım ve Sürenin Belirlenmesi

Aksaray İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'nden steril, 1000 ml hacimli erlenmayer içine 1000 ml çiğ süt alınmış, soğuk zincir kurallarına riayet edilerek hızla laboratuvara ulaştırılıp çalışma başlayana kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir. Uygulamadan önce tüm cam petri kapları, süt hacimlendirmek için kullanılacak olan cam mezür kuru sterilizasyon ile 170 °C'de 1 saat, gümüş plakalar ise (cam petri kabına alınmak kaydı ile), otoklavda 121 °C'de 1 atm basınçta 15 dk.

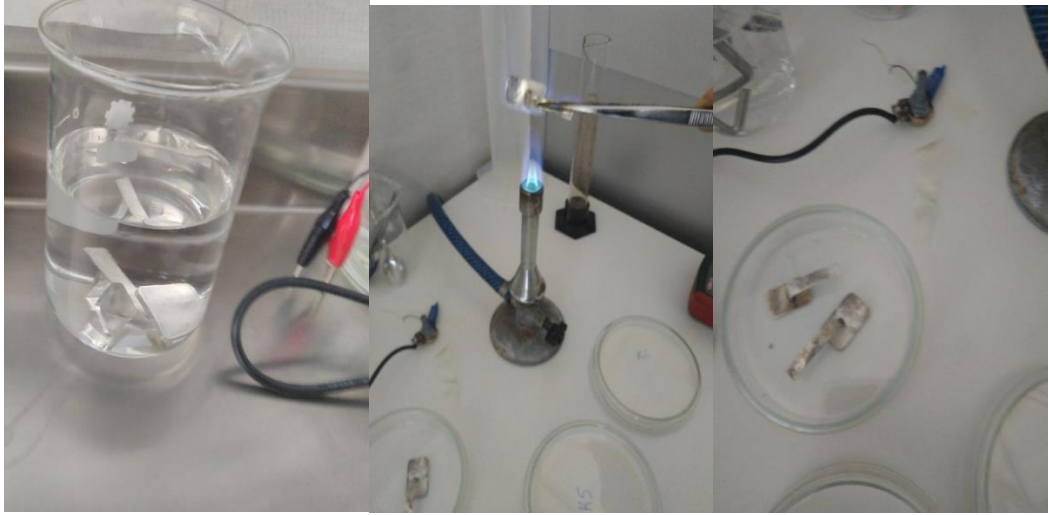
boyunca sterilize edilmiştir. 10 ml/L gliserol içeren CA besiyeri kullanım talimatına uygun şekilde, saf su ile hazırlanmış ve sterilize edilmiş, steril cam petri kaplarına 12.5'ar ml dökülmüştür. Ayrıca %0.9'luk NaCl ile 9'ar ml'lik dilüsyonlar hazırlanıp, otoklavda sterilize edilmiştir.

0.5 Mc Farland bakteri süspansiyonundan 0.1 ml alınarak (1.5×10^7) 1000 ml hacimdeki çiğ süte inoküle edilmiştir. Erlenmayer içindeki *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ilave edilmiş çiğ sütün homojen şekilde karışması sağlanmış ve steril mezür ile bek alevi altında, 40'ar ml olarak petri kaplarına paylaştırılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Steril cam petri kaplarına 40'ar ml çiğ sütün alınması.

Çalışmada planlanan her desen geçişleri arasında gümüş plakalar %70'lik alkolde 5 dk bekletilmiş, alevden geçirilerek alkol uzaklaştırılmış ve steril cam petri kabında soğutulduktan sonra kullanılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Plakaların alkolde bekletilip, bek alevinden geçirildikten sonra steril cam petri kabına alınıp, ağzı kapalı şekilde soğutulması.

Çalışmadaki 0. akım, uygulamanın başlangıç *Pseudomonas aeruginosa* yükü olarak kabul edilmiştir. 0. akım petrisine hiçbir gümüş anot tekniği uygulanmamış, sütler gümüş ile temas ettirilmemiş, direkt olarak CA'a yayma yöntemi ile 3'er paralelli olarak 10^{-4} dilüsyona kadar *Pseudomonas aeruginosa* ekimi yapıp, 35 ± 2 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce 1.5 Volt'luk saat pilinin avometre ile kaç volta sahip olduğu ölçülmüş ve Ohm kanunu hesabından ($I = V \div R$), 5-10-15 ve 20 μA değerlerinde akım elde etmek için potansiyometreyi hangi değerlere ayarlayacağımızın hesabı yapılmış ve not alınmıştır. Ayrıca gümüş plakalardan kaynaklanan direnç yaklaşık 1.9 Ω olarak ölçülmüş, fakat uygulanan direnç M Ω gibi çok yüksek düzeylerde olduğu için gümüş plakalardan gelen direnç önemsiz, etkisiz kabul edilmiştir.

Burada;

I: Akım, birimi “amper”

V: Gerilim, birimi “Volt”

R: Direnç, birimi ise “Ohm” dur.

Formülasyonda direnç ile akım arasında ters orantı bulunduğu için, direncin 1000 kat artması oluşan akım değerini de 1000 kat azaltacaktır. Buna göre direncin birimi 1000 kat artırılıp kiloOhm cinsinden alınırsa oluşan akım değerinin 1000 kat azalır

miliamper, direncin değeri 1.000.000 kat arttırılıp MegaOhm olarak alınırsa da oluşan akımın değerinin 1.000.000 kat azalıp MikroAmper boyutlarında olacağı hesaplanmıştır.

Güç kaynağından alınan akım, potansiyometre ile istenilen μA seviyesine ayarlanarak kısaçlı kabloların ucuna tutuşturulan gümüş kutuplara iletilmektedir. Ortamda iletken sıvının bulunması durumunda, anot kutbundan ayrılan gümüş iyonları sıvı içinde emülsüfyer halde bulunacaktır. Katot kutbunda gerçekleşen polarlanma anot kutbuna göre önemsenmeyecek kadar zayıftır.

Uygulama için saat pilinin mevcut yükü avometre ile 1.412 Volt olarak ölçülmüş ve formülasyona göre potansiyometre;

5 μA için 0.282 $\text{M}\Omega$

10 μA için 0.141 $\text{M}\Omega$

15 μA için 0.094 $\text{M}\Omega$

20 μA için ise 0.071 $\text{M}\Omega$ olarak ayarlanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Potansiyometrenin, avometre kontrolünde, hesaplanan $\text{M}\Omega$ seviyesine ayarlanması.

Uygulamada ayarlanan akım değerindeki gümüş plakalar, aynı zamanda iletken sıvı olarak görev yapacak olan çiğ süte daldırılmış ve kronometre ile istenilen süreler tutularak çalışma gerçekleştirilmiştir. Desenler arası geçişlerde gümüş plakalar

alkolde bekletilip, bek alevinde sterilize edilip soğutulduktan sonra kullanılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Ayarlaması yapılan gümüş anot düzeneginin bek alevleri arasındaki platforma sabitlenmesi (üstte solda), çalışmanın yapılması (üstte sağda), desenler arası alkolde bekletilen gümüş plakalar (altta solda) ve alkolden alınan gümüş plakaların alevden geçirilerek sterilize edilmesi (altta sağda).

Gümüş anot tekniği uygulanan tüm sütlerin 10^{-4} dilüsyona kadar seyreltmeleri yapılmış, CA besiyeri yüzeyine yayma yöntemi ile ekimleri yapılmış ve 35 ± 2 °C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda sayılan koloniler $\log_{10}$ tabanına göre çevrilmiş (Çizelge 4.4) ve Taguchi testi ile optimum akım-süre tespit edilmiş ve sonuçlar %95 güven aralığında bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Ekimler sonucunda elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* koloni sayıları (kob ml⁻¹).

süre (sn) → akım (μA) ↓	15 sn	30 sn	45 sn	60 sn
0 mikroA	2.18±0.05	2.18±0.05	2.18±0,04	2.18±0.06
5 mikroA	1.72±0.03	1.69±0.01	1.69±0.01	1.66±0.04
10 mikroA	1.58±0.01	1.57±0.02	1.56±0.02	1.51±0.01
15 mikroA	1.42±0.02	1.41±0.01	1.40±0.01	1.39±0.03
20 mikroA	1.39±0.01	1.37±0.02	1.34±0.01	1.31±0.02

Optimum akım ve sürenin belirlenmesinde önce taguchi test metodunun L₁₆ ortogonal (dikey) tablosu oluşturulmuş (Çizelge 4.5) ve bu tablodan faydalanılarak (S/N) oranları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). S/N oranları bu çalışmadaki optimum akım ve sürenin belirlenmesinde “en küçük en iyi” yaklaşımını baz alarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. L₁₆ ortogonal tablosu.

Test Id	Akım (μA)	süre (sn)	Nc (kob ml ⁻¹)	S/N oranı
1	5	15	1.72	-4.71057
2	5	30	1.69	-4.55773
3	5	45	1.69	-4.55773
4	5	60	1.66	-4.40216
5	10	15	1.58	-3.97314
6	10	30	1.57	-3.91799
7	10	45	1.56	-3.86249
8	10	60	1.51	-3.57954
9	15	15	1.42	-3.04577
10	15	30	1.41	-2.98438
11	15	45	1.40	-2.92256
12	15	60	1.39	-2.86030
13	20	15	1.39	-2.86030
14	20	30	1.37	-2.73441
15	20	45	1.34	-2.54210
16	20	60	1.31	-2.34543

Çizelge 4.6. Çıktı parametreleri için S/N yanıt tablosu.

Level	Akım (μ A)	Süre (sn)
1	-4.557	-3.647
2	-3.833	-3.549
3	-2.953	-3.471
4	-2.621	-3.297
Delta	1.936	0.351

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi çalışmanın bakteri koloni sayısına (Nc) yönelik yapılan sinyal/gürültü hesaplamalarında “en küçük en iyi” yaklaşımı sonucu optimum akım ve süre Akım₄Süre₄ kategorisindeki 20 μ A ‘de 60 sn. olarak tespit edilmiştir. 20 μ A’de 60 sn. gümüş anot uygulaması ile en düşük bakteri koloni sayısı olan 1.31 kob/ml değerine ulaşılmıştır. Çalışmanın güven aralığı hesaplamaları yapıldığında %95 güven seviyesinde yani $p < 0.05$ olarak tespit edilmiştir.

4.6. Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Tekniğinin Uygulanması

Çiğ inek sütünde lizozim ve gümüş anot tekniğinin, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun ve sütte doğal flora elemanı olarak bulunan *Pseudomonas aeruginosa*’nın gelişimi ve biyofilm oluşturması üzerinde etkilerinin gözlemlendiği çalışmaya başlamadan önce otoklavda sterilize edilen CA besiyeri 12.5’ar ml olmak üzere steril petri kaplarına dökülmüştür. 24, 48 ve 72. saatlerde kullanılacak olan besiyeri içeren petri kapları buzdolabına kaldırılmıştır. Uygulamada gümüş anot tekniğinin ve lizozim enziminin hem çiğ sütün doğal florasına, hem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ilave edilmiş baskın florasına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin gözlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın desen kodları boş steril cam petri kaplarının üzerine yazılmış ve çalışma deseninde lizozim enzimini içeren desenlerin petrilere (K2, K3, K6 ve K7), elde edilen MIC sonuçlarına göre, steril şartlarda 3.2’şer gram lizozim enzimi tartılmıştır (Şekil 4.14).



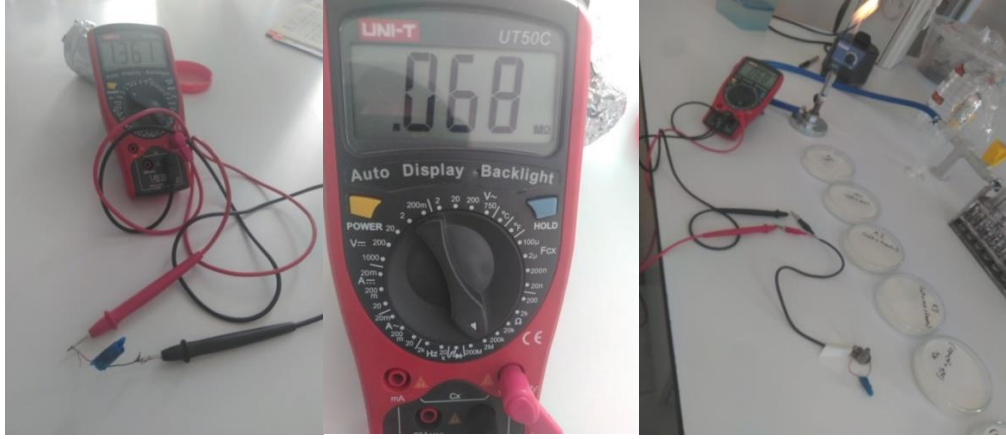
Şekil 4.14. Petri kaplarına CA besiyerinin dökülmesi (sağda), uygulama desenlerinin cam petri kaplarına yazılması (ortada), lizozim içeren desenlerin petri kaplarına lizozim enziminin tartılması (sağda).

Temin edildiği andan itibaren buzdolabında muhafaza edilen çiğ inek sütü bekletilmeden steril mezür ile K, K2, K4, K7 petrilere 40'ar ml, diğer kodlu petrilere ise 39'ar ml hacimlerde konulmuştur. Lizozim içeren petri kaplarına süt ilavesi yapıldıktan sonra, her bir petride ayrı spatula kullanılmak üzere, steril spatula ile karıştırılmış ve lizozim enziminin çözünmesi sağlanmıştır (Şekil 4.15).



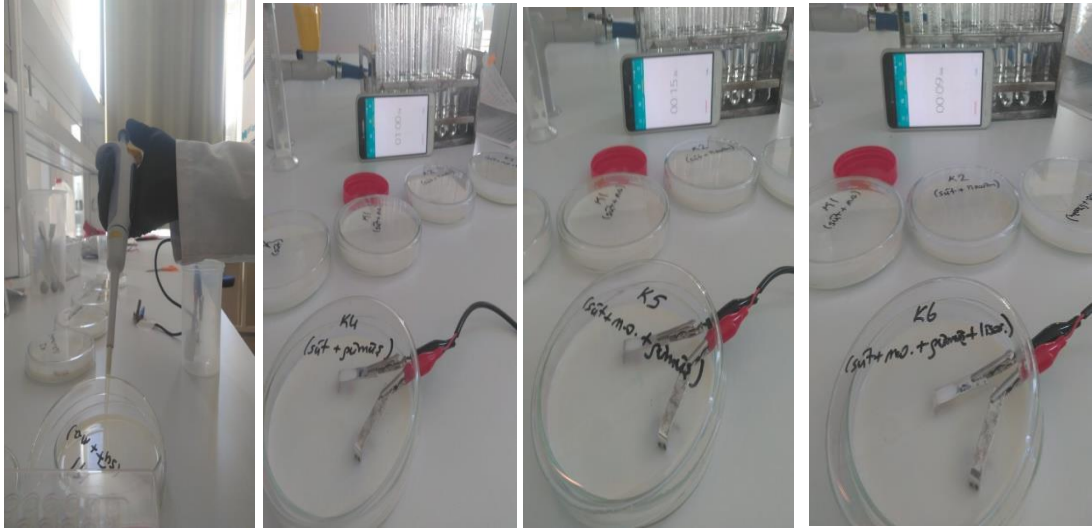
Şekil 4.15. Steril mezürün ve çiğ sütün buzdolabından çıkarılması (solda), sütün hacimlendirilmesi (ortada), lizozim enzimini steril spatula ile karıştırılması (sağda).

Çiğ süte katılan lizozim enziminin çözünmesini sağlamak amacı ile 5 dakikalık bekleme süresi belirlenmiştir. Bu esnada gümüş anot tekniğinin uygulanabilmesi için gerekli akım ayarlaması yapılmış ve gümüş kutuplar hazırlanmıştır. Saat pilinin mevcut gerilimi 1.361 volt ölçülmüş ve 20 μ A akımın oluşması için potansiyometrenin sağlaması gereken direnç ayarı 0.068 M Ω olarak hesaplanmış, potansiyometre bu değere sabitlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Gümüş anot uygulaması için pil gerilimi ölçümü (solda), potansiyometrenin direnç ayarının (ortada) yapılması ve teknik düzeneğin kurulması (sağda).

Gümüş anot uygulamasının teknik düzeneği kurulduktan sonra, çalışma deseninin *Pseudomonas aeruginosa* içermesi gereken, K1, K3, K5 ve K6 kodlu petri kaplarına 1 ml 0.5 McFarland bulanıklık değerinde (1.5×10^8) bakteri inokülasyonu yapılmıştır. Gümüş anot teknik düzeneğinin anot ve katot kutuplardaki kısıkaçlarına, otoklavda sterilize edilmiş gümüş plakalar takılmış ve sırası ile K4, K5, K6 ve K7 kodlu petrilere, daha önce *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı belirlenen 20 μA akımda 60 sn (1 dakika)'lık süre ile gümüş anot tekniği uygulanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. İlgili petri kaplarına bakteri inokülasyonu (solda), K4 çalışma desenine gümüş anot uygulaması (soldan ikinci), K5 desenine gümüş anot uygulaması (soldan üçüncü) ve K6 desenine gümüş anot uygulaması (sağda).

4.7. Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Uygulaması ile *Pseudomonas aeruginosa*'nın Biyofilmi Analizi Sonucu

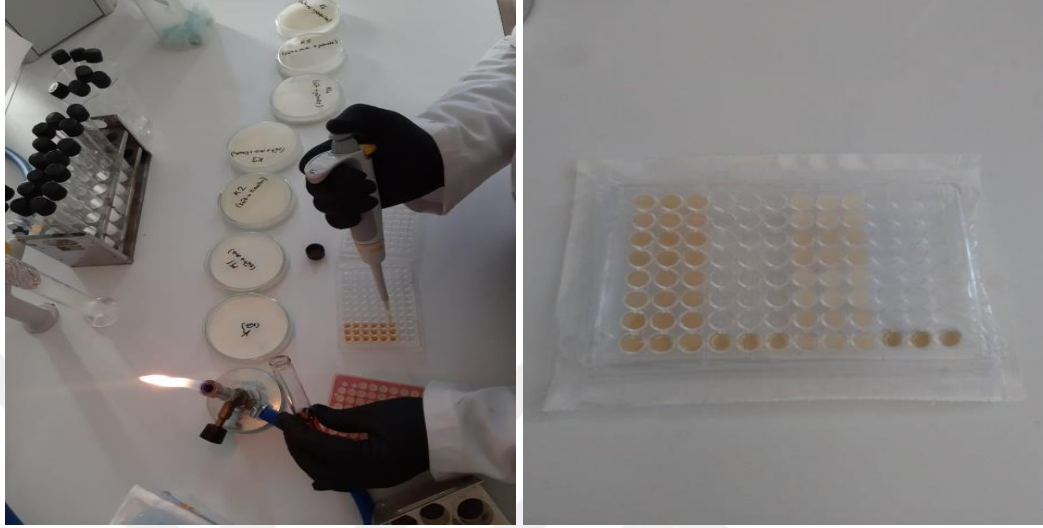
Çalışmanın her deseninden, 96 kuyucuklu mikrolate kuyucuklarına, biyofilm analizi için önce 100 µl TSB_G besiyeri daha sonra 100 µl numune alınmıştır. Çalışma desenleri 40'ar ml hacimdeki süt içinde yapıldığında, 1 ml 0.5 McFarland bulanıklık değerine sahip bakteri ilavesi ile 40 ml'lik sütün ml'sinde yaklaşık 3.75x10⁶ adet/ml kadar bakteri olacaktır. Biyofilm analiz tekniği gereği 20 µl numune alındığı zaman mikrolate hücreindeki bakteri sayısının 3.75x10⁴'e düşeceği ve biyofilm oluşumu açısından yetersiz kalabileceği öngörülmüş ve tedbiren mikrolate hücrelerine hem 180 µl TSB_G besiyeri + 20 µl örnek, hem de 100 µl TSB_G besiyeri + 100 µl örnek alınarak biyofilm deseni oluşturulmuştur (Başaran, 2019; Jain vd., 2019). 96 kuyucukta biyofilm numunelerinin yerleşim şekli Çizelge 4.7' de tarif edilmiştir.

Çizelge 4.7. 96 kuyucuklu mikrolakta biyofilm desenleri ve açıklamaları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K*	K*	K*				K''	K''	K''			
B	K1*	K1*	K1*				K1''	K1''	K1''			
C	K2*	K2*	K2*				K2''	K2''	K2''			
D	K3*	K3*	K3*				K3''	K3''	K3''			
E	K4*	K4*	K4*				K4''	K4''	K4''			
F	K5*	K5*	K5*				K5''	K5''	K5''			
G	K6*	K6*	K6*				K6''	K6''	K6''			
H	K7*	K7*	K7*	180µl TSB _G + 20 µl m.o.	180µl TSB _G + 20 µl m.o.	180µl TSB _G + 20 µl m.o.	K7''	K7''	K7''	TSB _G	TSB _G	TSB _G
*: 180µl TSB _G +20 µl numune grubu '': 100µl TSB _G +100 µl numune grubu												

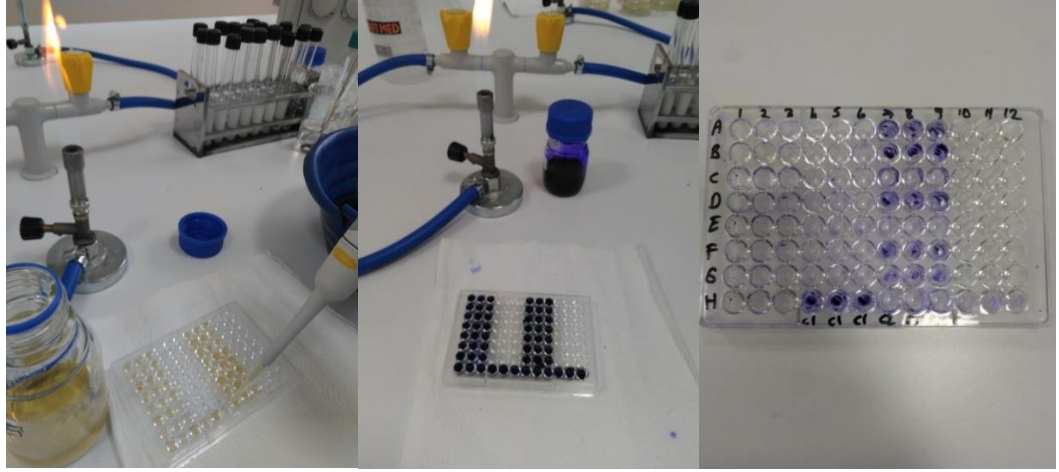
Çalışma deseni uygulanmış olan sütlere biyofilm analizi için, TSB_G besiyeri; A (1-2-3), B (1-2-3), C (1-2-3), D (1-2-3), E (1-2-3), F (1-2-3), G (1-2-3) ve H (1-2-3)

kuyucuklarına 180 µl eklenmiştir. A (7-8-9), B (7-8-9), C (7-8-9), D (7-8-9), E (7-8-9), F (7-8-9), G (7-8-9) ve H (7-8-9) kuyucuklarına ise 100 µl olarak eklenmiştir. 180 µl besiyeri eklenen kuyucuklara 20 µl, 100 µl besiyeri eklenmiş kuyucuklara ise 100 µl numune ilave edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Biyofilm analizi için kuyucuklara TSB_G alınması ve Mikroplate'in inkübasyon için kurumayacak şekilde kapatılması.

Bu şekilde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Spektrofotometrik analiz sonucu alınan verilerin değerlendirilmesinde sterilit kontrolü için sadece TSB_G içeren (negatif) kuyucuklar blank olarak alınmış, bakteri biyofilm pozitif kontrol grubu olarak 180µl TSB_G+20 µl m.o. (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) içeren şahit kontrol grubu baz alınmıştır. O'Toole (2011) mikroplate metoduna göre kuyucuklara, TSB_G ile yıkama, kristal viyole boyama ve asetik asitte çözündürme işlemleri yapılmış, spektrofotometrede absorbans değeri ölçülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan mikropate kuyucuklarının biyofilm analizi için hazırlanması.

Mikroplatelerin inkübasyonu sonrasında 1,2 ve 3. sütunlarda yer alan 180 µl TSB besiyeri + 20 µl örnek içerikli kuyucuklarda yeterli biyofilm oluşumuna rastlanılmamış, isabetli olarak 100 µl TSB besiyeri + 100 µl örnek içeren kuyucukların absorbans değerleri baz alınmıştır.

Biyofilm oluşum karakterinin değerlendirilmesinde faydalanılan semi kantitatif skala negatif kontrol kuyucuğuna göre hesaplanmış (Çizelge 4.8) ve desen içeriklerinin biyofilm oluşum karakteristiği absorbans değerlerine göre belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Negatif kontrol absorbans değerlerinin (0.232-0.234-0.231) standart sapması 0.001 hesaplanmış ve cut off (sınır değer) değeri, standart sapmanın iki katına, negatif kontrol kuyucuklarının ortalaması eklenerek 0.234 bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Semi kantitatif skalaya göre biyofilm oluşumu değerlendirme aralıkları.

Sınır değeri (cut off)	Biyofilm karakteristiği
$OD_{ort} \leq 0.234$	Biyofilm negatif (-)
$0.234 < OD_{ort} \leq 0.470$	Zayıf biyofilm oluşumu (+)
$0.470 < OD_{ort} \leq 0.940$	Orta biyofilm oluşumu (++)
$0.940 < OD_{ort}$	Güçlü biyofilm oluşumu (+++)

Çizelge 4.9. Uygulama desenlerinin absorbans sonuçları ve biyofilm oluşumu karakteristikleri.

Uygulama deseni	Absorbans (OD) değerleri				Biyofilm oluşum karakteristiği
	OD ₁	OD ₂	OD ₃	OD _{ort}	
K (A-7,8,9)	0.524	0.523	0.529	0.525	++
K1(B-7,8,9)	1.051	1.036	1.040	1.042	+++
K2(C-7,8,9)	0.274	0.276	0.281	0.277	+
K3(D-7,8,9)	0.624	0.623	0.629	0.625	++
K4(E-7,8,9)	0.197	0.198	0.198	0.198	-
K5(F-7,8,9)	0.439	0.441	0.440	0.440	+
K6(G-7,8,9)	0.232	0.231	0.233	0.232	-
K7(H-7,8,9)	0.133	0.134	0.133	0.133	-
Pozitif kontrol(PC) 27853 (H-4,5,6)	1.467	1.468	1.472	1.469	+++
Negatif kontrol (NC) (H-1,2,3)	0.232	0.234	0.231	0.232	-

Çalışmanın biyofilm analizi için eliza spektrofotometresinde elde edilen absorbans sonuçlarına göre K1 deseninde kuvvetli biyofilm oluşumu gözlemlenirken, K ve K3 desenlerinde orta kuvvetli, K2 ve K5 desenlerinde ise zayıf biyofilm oluşmuş, K4-K6 ve K7 desenlerinde de negatif biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Özellikle K ve K1 desenlerinde biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi, *Pseudomonas aeruginosa*'nın hızlı ve kuvvetli şekilde yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturduğunun süt sektörü açısından önemiyetini ve gerçekliğini doğrulamaktadır (Ayhan, 2016). Öte yandan K deseninde orta kuvvette, K1 deseninde ise güçlü biyofilm oluşumunun desenin içerdiği başlangıç bakteri yükü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, QS sisteminin sinyalleri sayesinde ortamdaki bakteri miktarını algılamakta ve artan bakteri sayısının yaşamsal tehdit oluşturması nedeni ile virülans faktörlerinden olan aljinat salgılayarak biyofilm oluşumunu başlatmaktadır. Bakteri yükü fazla olan ortamlarda bulunan her bakteri aynı girişimde bulunacak ve dolayısı ile biyofilm yapısının temeli olan aljinat miktarı da artacaktır (Gün ve Ekinci, 2009; Temel ve Eraç, 2018; Türetgen, 2006).

Lizozim enzimlerinin tek başına etken olarak yer aldığı K2 ve K3 desenlerinde, kontrol grubu olarak baz alabileceğimiz K ve K1 desenlerine göre biyofilm karakterleri 1'er şiddet azalma eğilimi göstermiştir. Ancak biyofilm oluşumu açısından kontrol grubu olan K ve K1 desenlerine göre en iyi azalma etkileri gümüş anot tekniğinin tek başına uygulandığı K4 ve K5 desenlerinde gözlemlenmiştir. Hatta K4 deseninin bakteri yükü K5 deseninin bakteri yüküne göre daha az olması sebebi ile biyofilm oluşum karakteri tamamen ortadan kalkmıştır.

Lizozim ve gümüş anot tekniklerinin bir arada uygulandığı K6 ve K7 çalışma desenlerinde biyofilm oluşumu açısından sinerjistik etki meydana geldiği ve bakteri yükü ne kadar farklı olsa da antibiyofilm etkinin kuvvetli şekilde gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Çalışmada uygulanan gümüş anot tekniği ve lizozim enziminin birbirleri arasında sütün doğal *Pseudomonas aeruginosa* florasına ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ilave edilmiş baskın floraya karşı biyofilm oluşumunu ne şekilde değiştirdiği Eşitlik (3.2)'deki % biyofilm hesabına göre yapılmıştır. Formülasyondaki OD_{son} değeri OD_{ilk} değerinden küçük olduğu için sonuçlar negatif yani biyofilm azalması yönünde ifade edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Çalışma desenlerinin birbirleri arasında biyofilm azalması yönünden karşılaştırılması.

Karşılaştırılan uygulama desenleri	% biyofilm farkı
K (OD_{ilk}) – K2 (OD_{son})	-47 (azalma)
K (OD_{ilk}) – K4 (OD_{son})	-62 (azalma)
K (OD_{ilk}) – K7 (OD_{son})	-75 (azalma)
K1 (OD_{ilk}) – K3 (OD_{son})	-40 (azalma)
K1 (OD_{ilk}) – K5 (OD_{son})	-58 (azalma)
K1 (OD_{ilk}) – K6 (OD_{son})	-78 (azalma)

% biyofilm sonuçları incelendiğinde çiğ sütte lizozim enziminin bulunduğu K2 ve K3 desenlerinde lizozim enzimi %47'lik azalmaya, K3 ve K1 desenlerinde ise %40 azalmaya neden olmuştur. Lizozimin muramidaz etkinliği nedeni ile N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin bağlantılarının hidrolizini katalize ederek özellikle hücre zarında kalın peptidoglikan tabakasına sahip olan gram pozitif bakterilerde kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile

hücre duvarında ince peptidoglikan tabakası içermesine rağmen, lipopolisakarit ve fosfolipitden oluşan hücre zarına sahip olan gram negatif bakterilere karşı zayıf antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (Yılmaz ve Tosun, 2013). Ancak son yıllarda lizozimin gram negatif bakterilere olan antibakteriyel etkisine dair önemli çalışmalar yapılmış ve oluşan antibakteriyel etkinin lizozimin enzimatik aktivitesinden kaynaklanmadığına dair ciddi kanıtlar ortaya konulmuştur (İbrahim vd., 2002; İbrahim, 2003; Masschalck ve Michiels, 2003).

Lizozimin gram negatif bakterilere olan antibakteriyel etkisini destekleyen çalışmaların büyük çoğunluğu pozitif yüklü lizozim (Zhang ve Rhim, 2022) ile negatif yüklü bakteri membran lipidleri arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşim nedeni ile peptid kümelerinin oluştuğunu ve dolayısı ile membran bütünlüğünü bozan kanalların oluştuğunu belirtmişlerdir (Duru ve Saçaklı, 2017; Hancock ve Lehrer, 1998; Huang, 2000; Küçük ve Kaplan, 2020; Özcan vd., 2018).

Çalışmamızın lizozim enziminin bulunduğu desenlerinde antibiyofilm aktivitesinin %40 seviyelerinde tespit edilmesinin sebebinin, lizozim ile katyonik etkileşimlere maruz kalan gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı oluşan antibakteriyel etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanısıra lizozim yüzeyinin polar yapıda ve dolayısı ile hidrofilik özellikte olmasının bakteri ile tutunma yüzeyi arasında bariyer görevi gördüğü bunun sonucunda da biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan yüzeye tutunmayı engelleyip mikrobiyal kirlenmeye karşı direnç geliştirdiği de belirtilmiştir (Khlyustova vd., 2022). Bu tespite dayanarak çalışmamızda gözlemlediğimiz antibiyofilm aktivitenin, lizozimin mikropate çeperlerinde *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı bariyer görevi görerek bakteriyel tutunmayı engellediğinden dolayı gerçekleştirildiği şeklinde yorumlamaktayız.

Literatürde çalışmamızın lizozim ile antibiyofilm sonucuna benzer şekilde Hukiç vd. (2018) lizozim enziminin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmini %50 engellediğini, Eladawy vd. (2020) ise %19 oranında biyofilm oluşumunu azalttığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın gümüş anot tekniği uygulanan K4 ve K5 desenlerini ilgili kontrol grupları olan K ve K1 ile kıyasladığımızda; K4 ile K arasında meydana gelen antibiyofilm etki %62 iken, K5 ve K1 arasında meydana gelen antibiyofilm etki %58

azalma göstermiştir. İki kıyaslama arasındaki %4 lük farkın desenler arasındaki başlangıç bakteri yükü ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Ancak her ne kadar *Pseudomonas aeruginosa* inoküle edilmiş desen ile edilmemiş desen arasında % antibiyofilm oranı yaklaşık çıksa da K4 desenin absorbans değeri ODcut off değerinin altında gerçekleşmiş ve biyofilm oluşumu negatif şeklinde yorumlanmıştır. Buda ortamın bakteri yükünün azaldıkça gümüş anot tekniğinin antibiyofilm etkinliğinin yükseldiğini göstermektedir.

Gümüş anot tekniğinde uygulanan elektrik akımının etkisi ile oluşan gümüş iyonlarının bakteri hücrelerini parçaladığı, hücre yapısında boşluklar oluştuğu, *Pseudomonas aeruginosa*'ya yüzeye tutunma kabiliyeti veren pili organında deformasyonların oluştuğu ve bölünme kusurlarının gerçekleştiği belirtilmiştir (Aydın, 1997; Dusane vd., 2008). Çalışmamızda uyguladığımız gümüş anot tekniği *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde hücre parçalayıcı etki oluşturmuş dolayısı ile hücre yapısı zarar gören *Pseudomonas aeruginosa* virülans faktör olan aljinat salgılayamamış veya pili organı deforme olduğu için yüzeye tutunamamıştır.

Literatürde çalışmamızın gümüş anot uygulanan biyofilm sonuçlarını doğrular nitelikte sonuçlar mevcuttur (Bjarnsholt vd., 2007). Kalishwaralal vd. (2010) mikrobiyal keratit tedavisinde belirli seviyedeki gümüş nanopartiküllerin bakteri üremesini %90 oranında inhibe ettiğini dolayısı ile bakterinin ekzopolisakkarit sentezinin de durduğunu ve bu sayede biyofilm oluşturamadığını gözlemlemiştir. Sharma vd. (2015), farmasötik sektöründe *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin neden olduğu patojenite ile mücadele edebilmek için farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat ile antibiyofilm çalışmaları yapmışlardır. Sonuçta gümüşün *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı güçlü antibiyofilm ve antimikrobiyal ajan olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın en yüksek antibiyofilm % değerleri sırası ile %75 ve %78 azalma oranları ile K-K7 ve K1-K6 desen karşılaştırmaları arasında gözlemlenmiştir. K6 ve K7 desenlerinde ODcut off değerinin altında ve eşitinde absorbans değerleri de gözlemlendiği için biyofilm oluşumu negatif olarak yorumlanmıştır. Bu desenler çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı lizozim ve gümüş anot tekniğinin bir arada kullanıldığı ve sonuçlardan da anlaşıldığı üzere sinerjist antibiyofilm etkisinin gözlemlendiği desenlerdir. Daha önceki desenlerden anlaşıldığı üzere lizozim tek

başına ortalama %43 seviyelerinde biyofilm azalmasına neden olurken gümüş anot tekniği tek başına ortalama %60 seviyelerinde antibiyofilm etki göstermiştir. Ancak lizozim ve gümüş anot tekniğinin bir arada kullanıldığı desenlerde ortalama %77 gibi yüksek bir antibiyofilm etki oluşmuştur. K6 ve K7 desenlerinde biyofilm oluşumunun negatif olması çeşitli maddeler ile ilişkilendirilebilmektedir. Antibiyofilm etki nedenleri gümüş anot tekniğinin bakteri hücrelerini inhibe etmesi, lizozimin hem ortam yüzeyi ile bakteri arasında hidrofilik bir bariyer oluşturması hem de gram negatif bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* ile arasında elektrostatik çekim kuvveti oluşmasından dolayı hücre zarına bağlanarak nonenzimatik antibakteriyel etki göstermesi şeklinde sıralanabilmektedir.

4.8. Çiğ Sütte Lizozim ve Gümüş Anot Tekniğinin *Pseudomonas aeruginosa*' ya Karşı Antibakteriyel Etki Sonucu

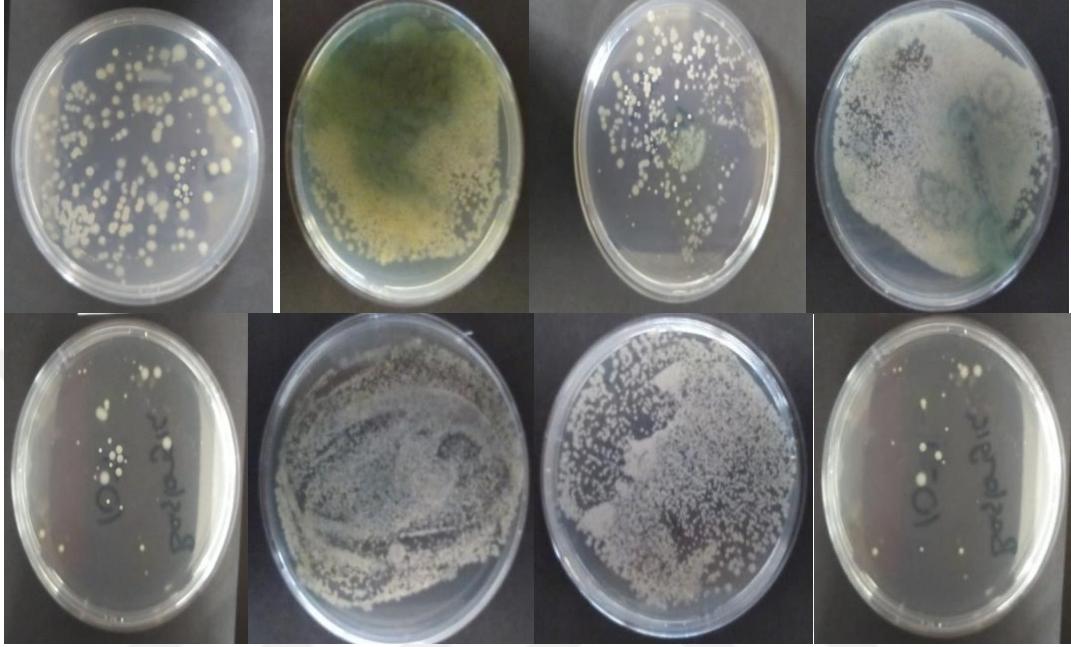
Gümüş anot tekniği uygulamasından sonra çalışmanın tüm desenlerinden (K, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7), 10^{-4} 'e kadar seri dilüsyonlar oluşturulmuş ve CA besiyeri üzerine yayma tekniği ile her desen 3'er paralel olacak şekilde koloni ekimi yapılmış, 35 ± 2 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Bakteriyolojik ekim için seri dilüsyonların hazırlanması (solda), vortexlenmesi (ortada) ve ekimin yapılması (sağda).

Uygulamanın yapıldığı andaki mikrobiyolojik ekimler 1. saat olarak baz alınmıştır. Mikrobiyolojik numuneleri alınan petri kapları hızla buzdolabına kaldırılmış ve 24 saat sonraki mikrobiyolojik ekim için süre tutulmaya başlanılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlanan petri kaplarına koloni sayımları yapılmış ve $\log_{10}$ tabanına çevrilip, desenler arası istatistiki hesaplamalar yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan gümüş anot tekniği ve lizozim enziminin, süt ile ilk buluştuğu andan itibaren sütün doğal florasındaki *Pseudomonas aeruginosa*'ya ve inoküle edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna olan antibakteriyel etkisi başlangıç (1. saat) ekim sonuçlarını içeren petrilere gösterilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Üst soldan sağa doğru K, K1, K2, K3 ve alt soldan sağa doğru K4, K5, K6 ve K7 kodlu çalışma desenlerinin başlangıç (1. saat) 10^{-1} dilüsyonun koloni ekim sonuçları.

Koloni sayım sonuçları Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Çiğ süt üzerinde lizozim enziminin ve gümüş anot tekniğinin *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkisine dair koloni sayıları.

	1.saat	24. saat	48. saat	72. saat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (log cfu/mL)				
K	2.08 ± 0.17^{d1}	2.33 ± 0.05^{c1}	2.48 ± 0.40^{b1}	2.70 ± 0.55^{a1}
K2	2.07 ± 0.01^{c1}	2.21 ± 0.02^{b2}	2.36 ± 0.05^{a2}	2.25 ± 0.01^{b2}
K4	1.26 ± 0.03^{a2}	1.18 ± 0.02^{b3}	1.13 ± 0.04^{c3}	1.11 ± 0.02^{c3}
K7	1.26 ± 0.01^{a2}	1.06 ± 0.01^{b4}	0.86 ± 0.03^{c4}	0.54 ± 0.09^{d4}

*Farklı üst simgeler içeren satır bazında (alfabe) ve sütun bazında (sayısal) önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.12. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 inoküle edilmiş çiğ sütte, lizozim ve gümüş anot tekniğinin antibakteriyel etkisine dair koloni sayıları.

	1.saat	24. saat	48. saat	72. saat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (log cfu/mL)				
K1	5.57 ± 0.03 ^{d1}	5.93 ± 0.02 ^{c1}	6.15 ± 0.04 ^{b1}	6.45 ± 0.03 ^{a1}
K3	5.56 ± 0.04 ^{c1}	5.62 ± 0.04 ^{b2}	5.68 ± 0.04 ^{ab2}	5.70 ± 0.03 ^{a2}
K5	4.53 ± 0.05 ^{a2}	4.44 ± 0.02 ^{b3}	4.40 ± 0.02 ^{b3}	4.39 ± 0.06 ^{b3}
K6	4.52 ± 0.03 ^{a2}	4.26 ± 0.01 ^{b4}	4.09 ± 0.02 ^{c4}	3.92 ± 0.02 ^{d4}

*Farklı üst simgeler içeren satır bazında (alfabe) ve sütun bazında (sayısal) önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$).

Çalışmamızda çiğ sütte lizozim ve gümüş anot tekniğinin antibakteriyel etkilerini içeren tablo incelendiğinde, 20 μ A'de 60 saniye süre ile gümüş anot tekniği uygulanan sütlerde kontrol gruplarına göre önemli farklılıklar gözlenmiştir ($p < 0.05$). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 inoküle edilmeyen K deseninin soğuk muhafaza koşulları boyunca bakteri yükü logaritmik olarak artmıştır. K desenine lizozim enzimi ilavesi ile oluşturulan K2 deseninde enzimin antibakteriyel etkisi ancak 24 saatlik depolama süresinde görülmeye başlanmıştır, tüm depolama süreçleri boyunca lizozim kontrol grubu olan K ya göre bakteri gelişimini durdurucu etki oluşturmuştur ($p < 0.05$). Çalışmamızda enzim ile muamelenin 1. ve 24. saatinde elde ettiğimiz sonuç Eladawy vd., (2020)' nin çalışmalarında 16 saatlik inkübasyon süreci boyunca lizozim enzimi ile muamele edilen bakteri canlılığının, enzim ile muamele edilmeyen kontrol grubu ile benzer olduğunu belirtmesi ile paralellik göstermektedir. K2 deseninde tüm depolama süresi boyunca görülebilen antibakteriyel etki kontrol grubuna kıyasla süreye göre artmış ancak en fazla 0.75 log luk azalma gerçekleşmiştir. Lizozimin gram negatif bakterilere olan antibakteriyel etkisinin enzimatik aktiviteden ziyade bakteri ile enzim yüzeyi arasındaki katyonik etkileşimler sonucu gerçekleştiğini belirtmiştik (Duru ve Saçaklı, 2017; Hancock ve Lehrer, 1998; Huang, 2000; Küçük ve Kaplan, 2020; Özcan vd., 2018). Ancak mikrobiyal ekim sonuçlarına göre görülmüştür ki antibakteriyel etkide enzimin elektrostatik özellikleri ile beraber enzimle bakterinin temas süresinin uzaması ulaşılacak antibakteriyel etkiyi de arttırmaktadır. Nihayetinde çalışmanın

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 suşu inoküle edilmiş olan K3 ve K1(kontrol) gruplarında da birbirini doğrularcasına benzer antibakteriyel etkilere rastlanmıştır. K3 deseninde kontrol grubuna (K1) kıyasla lizozim enzimi ancak 24. saatten itibaren antibakteriyel etki göstermeye başlamış, tüm depolama süreçleri boyunca zayıf bir şekilde enzimin antibakteriyel aktivasyonu devam etmiştir. Lizozim enzimi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerinde bakteriyostatik etki göstermiştir ($p<0.05$).

Eagon ve Carson (1965), *Pseudomonas aeruginosa*'nın hücre duvarlarının ve sağlam hücrelerinin etilendiamin tetraasetik asit ve lizozim tarafından lizisini gözlemlemeyi hedefledikleri çalışmalarında lizozimin tek başına *Pseudomonas aeruginosa* hücresi üzerinde etkili bir parçalamaya sebep olmadığını ancak tamamen de etkisiz olmadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca bakterinin lizozim ile muamelesini elektron mikroskopunda incelemişler ve lizozim ile inkübasyona uğrayan bakterinin hücre duvarlarında balonlaşmadan kaynaklanan şişmiş görüntüler gözlemlediklerini de belirtmişlerdir. Ancak bu bağlanmanın kalıcı olmadığını, lizozimin bakteri hücresinin yüzeyine bağlandığını ve yıkama ile kolaylıkla uzaklaşabileceğini de gözlemlemişlerdir.

Çalışmada gruplar arası lizozim aktivitesi açısından kıyaslama yapacak olursak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu ilave edilen grupta da, sütün doğal *Pseudomonas aeruginosa* florası ile çalışılan grupta da bakteri sayıları aynı olmamasına rağmen görülen antibakteriyel etki oranı benzer seyretmiştir. Oluşan bu tabloyu *Pseudomonas aeruginosa*'nın hücre yapısında bulunan ve lizozime karşı bakteriyi koruyucu vazife gören, periplazmik protein olan Ivp1 inhibitörünün devreye girmesi ve bakterinin lizozime karşı kendini savunmaya alması ile ilişkilendirebiliriz (Liu vd., 2015). Deckers vd. (2008), *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın ivy inhibitör aktivitelerini çeşitli türlerde ve oranlarda lizozim içeren ortamlarda gözlemlemek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında bakterinin konak savunması olan ivy inhibitörünün etkisizleştirilmesi ile anne sütündeki lizozime direnç gösterdiğini ancak yumurta akındaki lizozime karşı daha duyarsız olduğunu tespit etmişler, en iyi lizozim antibakteriyel etkisini de insan tükürüğündeki lizozim ortamı içinde elde etmişlerdir.

Çalışmanın K4 deseninde süte tek başına 20 μ A'de 60 saniye boyunca gümüş anot tekniği uygulanmış ve uygulandığı andan itibaren özellikle ilk 24 saatlik depolama sürecine kadar önemli antibakteriyel etki gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Aynı uygulamanın *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu ilave edilmiş olan K5 deseninde de tekniğin uygulandığı ilk andan itibaren kontrol grubuna (K1) göre anlamlı antibakteriyel etki görülmüş ve depolamayı takip eden 24 saat içinde de etkinin devam ettiği gözlemlenmiştir ($p<0.05$).

Literatürde gümüş iyonlarının sergilediği antibakteriyel etki ve bakteri direnç mekanizmasının gelişmediğinin gösterildiği önemli çalışmalar bulunmaktadır (Agnihotri vd., 2014; Chung vd., 2016; Kılınç ve Sürengil, 2015; Mlalila vd., 2017; Prasher vd., 2018). Gümüşün antibakteriyel yelpazesinde gram pozitif ya da negatif bakteri ayırımı olmaksızın, direkt bakteri hücre yapısının DNA zincirlerini bozduğu belirtilmiştir. Modak ve Fox (1973), Gümüş Sülfadizin'in *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etki mekanizmasını Ag ve izotoplarını kullanarak araştırmışlardır. Sonuçta bileşikten gümüş iyonlarının ayrılarak bakterinin hücre proteinlerini ve karbonhidratları içeren gruplarına (DNA) bağlandığını, özellikle inkübasyonun log fazında değişen süreler ile beraber gümüş bağlı DNA miktarında da değişimler olduğunu, bağlanmanın log fazda tepe noktasına ulaştığını ve sonrasında giderek azaldığını belirtmişlerdir. Modak ve Fox, çalışmasında tespit ettiği DNA ve gümüş bağlanma oranının belirli seviyenin altına düşene kadar *Pseudomonas aeruginosa* üremesinin olmadığını da belirtmiştir.

Çalışmamızda gümüş anot tekniği ile gümüşün iyonlaşması sağlanmış, uygulanan elektrik akımının itici gücü sayesinde de gümüş iyonlarının çalışmanın yapıldığı tüm alana yayılması sağlanmıştır. Gümüş anot tekniği ile gümüş iyonlarının ortamda bulunuşundan dolayı K4 ve K5 desenlerinde soğuk depolamanın 48. ve 72. saatlerinde *Pseudomonas aeruginosa* üremesini durdurucu etkisinin gözlemlenmesi Modak ve Fox'un bu tespitini doğrular niteliktedir.

Gümüş anot tekniğinde uygulanan akım gümüş iyonlarının daha uzak noktalara ulaşmasını sağlamakla beraber aynı zamanda bakteri hücre yapısını da tahrip etmektedir (Aydın, 1997; Dusane vd., 2008). Dolayısı ile hücre yapısı parçalanmış *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı ortaya çıkan antibakteriyel etki geri dönüşümsüzdür. Hatta hücre zarı parçalanmayıp kısmen zarar gösteren bakteri dahi

bir süre sonra yaşamsal faaliyetlerini sürdüremeyip inhibe olmaktadır. Dolayısı ile gümüş anot tekniğinin bakteriyostatik ve bakteriyosidal etkisi uzun süre devam edebilmektedir (Dusane vd., 2008; Çibik ve Duran, 2022). Çalışmamızda gözlemlediğimiz uzun depolama süreçlerinde dahi bakteriyosidal aktivitenin devam etmesi literatürü doğrular niteliktedir.

Çalışmamızın K6 ve K7 desenleri gümüş anot tekniğinin ve lizozim enziminin antibakteriyel açıdan sinerjist etkilerinin bir arada gözlemlenmeye çalışıldığı desenlerdir. Elde edilen veriler sonucunda her iki desenin de ilgili kontrol gruplarına (sırasıyla K ve K1) göre, çalışmanın her depolama süresi ve her kombinasyonunda önemli seviyede sinerjist bakteriyosidal etki göstermiş ve istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar sergilemiştir ($p<0.05$). K6 deseninin 72 saatlik nihai depolama süresi sonucunda kontrol grubuna göre 2.5 log luk azalma gözlenirken, K7 deseninde ise 72. saatin sonunda 2.2 log luk bir azalma gözlenmiştir. Antimikrobiyal etki çalışmalarında antibakteriyel etkiden bahsedebilmek için etkenin organizma üzerinde 2 logaritmik azalma sağlaması güçlü (%99), 3 log ve daha fazla azalma sağlaması çok güçlü (%99.9) antimikrobiyal etkinin olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Toker, 2006). Çalışmanın antimikrobiyal etkinlik kısmının geneline baktığımızda her sürede ve her kombinasyonda en güçlü antibakteriyel etki lizozim ve gümüş anot tekniğinin bir arada kullanıldığı K6 ve K7 desenlerinde gözlenmiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızı destekler nitelikte literatürde lizozim ve gümüşün sinerjist etkisinin ispatlandığı gözlemlerde mevcuttur. Ernest vd. (2013), lizozim-AgNP konjugatlarının sinerjik antimikrobiyal etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında gümüş nanopartiküllerle etkileşime giren lizozim enziminin ikincil sarmal yapısının bozulduğunu, enzimin doğal 3 boyutlu yapısında değişiklikler oluştuğunu ve bunun da enzimin bakteri hücresi üzerinde katalitik aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Lizozim konsantrasyonunun arttıkça, AgNP ve lizozimin sinerjistik etkisi ile birlikte bakteriyel büyüme inhibisyonunun da arttığını görmüşlerdir. Sonuçta lizozim-AgNP konjugatının bakteri inhibisyonunu %86'ya kadar arttırdığını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde Meesaragandla vd. (2022)' de lizozim ve AgNPlar arasındaki etkileşimleri gözlemlemek için yaptıkları çalışmalarında lizozim çözeltilerinde AgNP konsantrasyonlarının artması ile beraber eliptik yapının değiştiğini ve lizozimin yapısının α -heliksten β -yaprak açılımına geçtiğini belirtmişlerdir.

4.9. Çiğ Sütteki Ag⁺ Miktarı Analiz Sonucu

ICP-MS cihazı ile yapılan çiğ sütteki Ag⁺ iyonu tespiti sonucunda elde edilen Ag⁺ miktarı Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. 20 µA’de 1 dk. akım uygulanan sütteki Ag⁺ miktarı.

Numune	Ag ⁺ miktarı (ppb*)
Çiğ süt	3.882 ± 0.01

ppb*: µg/L

20 µA lik akımın ve 60 saniye uygulanması ile sütte tespit edilen gümüş iyon miktarı 3.882 µg/L olarak tespit edilmiştir. Bu miktar EPA(1991)’nın izin verdiği oral gümüş maruziyet sınırının çok çok altındadır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA, 1991)’nın bu konuda yayınlanan bildirisinde; oral gümüş maruziyeti kişi başına ortalama referans değer 5 µg/kg/gün ve kişi başına kritik toksik maruziyet dozu ise 14 µg/kg/gün olarak belirtilmiştir (Mijnendonckx vd., 2013). Benzer şekilde Çibik ve Duran (2022), çiğ sütün doğal florasındaki bakterileri inhibe etmeye yönelik yapmış oldukları gümüş anot çalışmalarında 5 µA’lik akımı 20 dakika boyunca çiğ sütte uygulamışlar ve ortalama 3.3 µg/L’lik bir Ag iyon migrasyonu tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Süt işletmelerinde en güçlü *Pseudomonas aeruginosa* kaynağı işletmenin temel hammaddesi olan süttür. Islak ve yeterli hijyenik donanımına sahip olmayan sağıım ortamlarından süte çok rahatlıkla kontamine olabilen *Pseudomonas aeruginosa*, soğuk muhafaza koşullarında dahi sütte bozulmalara sebep olabilmektedir. Hatta ilerleyen metabolik faaliyetleri sonrasında oluşturduğu proteolitik ve lipolitik enzimler, bakteri ısııl işlemle inaktif olsa bile gıdada aktif şekilde bulunarak enzimatik bozulmalara sebep olabilmektedir. Ayrıca işletmenin süt aktarım boru hatlarında, depolama tanklarında, bağlantı noktalarında, ısııl işlem hatlarında, diğer alet ve ekipmân yüzeylerinde oluşan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinden zamanla kopan aktif bakteriler, son ürün ile kolayca kontamine olmaktadır. Bunun sonucu olarak da özellikle içme sütlerini sıklıkla tüketen süt çocuklarının akciğerlerine yerleşip, kistik fibröz gibi ciddi üst solunum yolu infeksiyonlarına sebep olabilmektedirler.

Bu çalışmada çiğ süütün doğal flora elemanı olan *Pseudomonas aeruginosa*'ya ve baskın florada yer alan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı lizozim ve gümüş anot tekniği ile antibakteriyel ve antibiyofilm etkiler gözlemlenmeye çalışılmıştır. Antibakteriyel etkinin gözlenmesi koloni ekim yöntemine göre, antibiyofilm etkinin gözlenmesi de mikropate kuyucuklarında absorbans değerlerine göre yapılmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen veriler incelendiğinde gümüş anot tekniğinin tek başına dahi süte uygulanması ile biyofilm oluşumunun %60 düzeyinde engellediğini, ancak lizozim ile sinerjistik etkisi durumunda biyofilm oluşumuna %77 gibi ciddi oranlarda mani olduğu görülmüştür. Süt sektöründe özellikle kör noktalar olarak tabir edilen, fiziksel temizliğin çok zor olduğu ve hatta belkide kimyasal temizliğin yetersiz ulaştığı noktalarda biyofilm ile mücadele etmek oldukça zordur. Sonuçta ürünün her daim biyofilm içindeki patojen bakteri ile kontamine olması olasıdır. Elde edilen bu sonuçların, sahip olduğu organeller ve virülans faktörler sayesinde özellikle süt sektöründe hızlı ve güçlü biyofilm oluşturabilen *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı elde edilmiş olması da bu bakteri ile mücadele girişimlerinde alternatif yöntem olarak önem arz etmektedir.

Çalışmamızda sinerjist etkileşim ile bakteriyosidal etkiyi gözlemlediğimiz K6 ve K7 desenlerinde güçlü antibiyofilm etkinin de oluşması lizozim ve gümüş anot tekniğinin süt sektöründe birarada kullanılarak *Pseudomonas auroginosa* ile mücadele edilmesi konusunda ümit vaat etmektedir. Çalışmamızda lizozim enzimini tercih etmemizdeki en önemli etken, lizozimin zaten sütün doğal olarak yapısında bulunan antibakteriyel ajanlardan biri olmasıdır. Böylece sütün doğal yapısına da fazlaca müdahale edilmediğini öngörmekteyiz. Tek başına lizozim enzimi sütte bakteriyostatik etkiye neden olmuşken, gümüş anot tekniği ile gümüş anodun hem tek başına hemde lizozim enzimi ile beraber uygulanması sonucu oluşan sinerjist etkileşimler sayesinde 2 log luk azalmanın üstünde seyreden güçlü bakterisidal etki gözlemlenmiştir. Özellikle gümüş anot tekniğinin, sütün kimyasal yapısında ve sıcaklığında herhangi bir değişikliğe sebep olmamasının (Çibik ve Duran, 2022) da, tekniğin sektöre entegre edilmesinde avantaj teşkil ettiği düşünülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda kullandığımız kombinasyonların süt tesislerine veya süt nakliye tank ve sistemlerine dâhil edilmesi ile ısıtma işlem safhasına kadar sütte etkili bir antimikrobiyal aktivite sağlanmış olunacağı, bakteriyel inaktivasyonun sağlanmasının dolaylı olarak biyofilm oluşumlarını azaltacağını öngörmekteyiz.

Gümüş anot tekniği sonucunda ortama gümüş iyonları yayılmaktadır. Çalışmanın uygulandığı materyalin gıda olması sebebi ile 20 μ A lik akımın ve 60 saniye uygulanması sonucu gümüşün ne derece iyonlaştığı dolayısı ile süte geçecek olan gümüş iyonlarının miktarı önem arz etmiştir. Her ne kadar yasal limitlerin altında tespit edilse de özellikle ısıtma aşamasından önce süttten gümüş iyonlarının uzaklaştırılması ile daha güvenli gıda tüketiminin sağlanabileceğini öngörmekteyiz. Bu konuda literatürde aktif karbon lif membranları ile gümüş iyonlarının karboksil (-COOH) veya hidroksil (-OH) içeren gruplar tarafından tutulup ayrıştırılmasına dair ilgi çekici ve çözüm mahiyetinde çalışmalar mevcuttur (Soliman et al., 2022). İyon tutucu membran tekniklerinde hidrojen iyonlarının ortama salınmasının sütün asitlik derecesinde artışa neden olabileceği düşünülse de hidrojen iyonları ile yer değiştiren gümüş iyon miktarı çok az olacağı için asitlik derecesindeki artışın da önemsiz seviyede olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasoglu, U., 1996. Antimikrobiyal aktivite araştırma yöntemleri, Fabad J. Pharm. Sci, 22, 111-118.
- Açu, M., Yerlikaya, O. ve Kınık,Ö., 2014. Gıdalarda ısıl olmayan yeni teknikler ve mikroorganizmalar üzerine etkisi, Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi, 11, 14, 23–35.
- Agnihotri, S., Mukherji, S. ve Mukherji, S., 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, Royal Society of Chemistry Advances,, 4, 8, 3974–3983.
- Akgün, M. ve Demir, H., 2020. Optimization and finite element modelling of tool wear in milling of inconel 625 superalloy, Journal of Polytechnic, 24, 2, 391–400.
- Akinbi, H. T., Epauld, R., Bhatt, H. ve Weaver, T. E., 2000. Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice, The Journal of Immunology, 165, 5760–5766.
- Akoğlu, A., 2006. Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Alaşlar, C., 2020. Moleküler rezonansın çiğ sütün mezofilik ve psikrotrofik aerobik mikroflorası üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Alişarlı, M., Solmaz, H. ve Akkaya, L., 2003. Süt ineklerinde meme başı derilerinin bazı mikroorganizmalar ve çiğ sütlerinin de mikrobiyolojik kalite yönünden incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 14, 1, 35-39.
- Al-Khazrajia, S. F. R. ve Al-Maenia, M. A. R., 2021. Optimization of some environmental and nutritional conditions using microtiter plate for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, Journal of Animal Behaviour and Biometeorology, 2021, 9, 2136.
- Altuner, E. E., 2014. Nano kremlerin üretimi, Karaelmas Science and Engineering Journal, 4, 1, 52–57.
- AOAC., 2005. Official methods of analysis of association of official analytical chemists international (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC.
- Arıca, M. Y. ve Bayramoğlu, G., 2004. Purification of lysozyme from egg white by reactive blue 4 and reactive red 120 dye-ligands immobilised composite membranes, Process Biochemistry, 40, 3–4, 1433–1442.
- Arifoviç, M. ve Turhan, S., 2019. SI revizyonu ; amperin yeniden tanımlanması volt ve ohm birimlerine etkisi, Ölçüm Bilim Sempozyumu ve Sergisi, 20-22 Kasım 2019, 158–165.

- Arslan, S., 2011. *Lactobacillus Rhamnosus*'un sünme (rope) hastalığı etkeni olan *Bacillus* cinsi bakteriler üzerine inhibitör etkisinin unlarda araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- AshaRani, P. V., Hande, M. P. ve Valiyaveetil, S., 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles, *BMC Cell Biol.*, 10, 65, 1-14.
- Asif, M., 2020. Natural anti-quorum sensing agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Chemical Reviews*, 2, 1, 57–69.
- Aydın, M., 1997. Diş apselerinde gümüş anot uygulaması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Aydın, M., Serin, M. S., Pelit, A. ve Gunay, I., 1997. Silver anode-induced phenotypical changes in bacteria, *Annals of Medical Sciences*, 6, 2, 83–87.
- Ayhan, D. K., 2016. Süt işletmelerinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Başar, C. S. ve Heperkan, Z. D., 2021. Sütün mikrobiyotasi ve bozulmasına yol açan önemli bakteriler, *Gıda*, 2021, 46, 3, 660–668.
- Başaran, T. I., 2019. Liken ve endolikenik bakteri özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing mekanizması ve biyofilm formu üzerine etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. ve Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 4, 493-496.
- Belas, R., 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria, *Trends in Microbiology*, 22, 9, 517–527.
- Beykaya, M. ve Çağlar, A., 2015. An Investigation on Synthesis of Silver-Nanoparticles (AgNP) and their Antimicrobial effectiveness by using Herbal Extracts, *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 16, 3, 631–641.
- Biçer, M., 2018. Bakteriyel biyofilm oluşumunu engelleyecek moleküllerin sentezi ve anti-biyofilm etkinliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çorum.
- Bilgin, S., 2010. Pirinç kabuğuna ilave edilen Ag^+ iyonunun karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Kristiansen, S., Phipps, R., Nielsen, A. K., Østrup Jensen, P., Hoiby, N. ve Givskov, M., 2007. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *APMIS*, 115, 8, 921–928.
- Bollela, V. R., Sato, D. N. ve Fonseca, B. A. L., 1999. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 9, 1073–1076.

- Braun, S., Ilberg, V. ve Langowski, H. C., 2021. Antimicrobial effectiveness of beverage containers made of silver doped PET, *Journal of Food Engineering*, 300, 2021, 110526.
- Brooks, J. D. ve Flint, S. H., 2008. Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions, *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 12, 2163–2176.
- Brown, V. I. ve Lowbury, E. J., 1965. Use of an improved cetrinide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal Of Clinical Pathology*, 18, 6, 752–756.
- Canıylmaz, E. ve Kutay, F., 2003. Taguchi metodunda varyans analizine alternatif bir yaklaşım, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 18, 3, 51–63.
- Chen, X. ve Stewart, P., 2000. Biofilm removal caused by chemical treatments, *Water Research*, 34, 17, 4229–4233.
- Chung, I. M., Park, I., Hyun, K. S., Thiruvengadam, M. ve Rajakumar, G., 2016. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications, *Nanoscale Research Letters*, 11, 40, 1–14.
- Conrad, J. C., 2012. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: Implications for biofilm formation, *Research in Microbiology*, 163, 619–629.
- Çibik, S. ve Duran, A., 2022. The antibacterial effect of silver anode treatment on raw milk, *Food Bioscience*, 50, 102140.
- Çorman, M. E., 2010. Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve lizozim saflaştırılmasında kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Aydın.
- Deckers, D., Vanlint, D., Callewaert, L., Aertsen, A. ve Michiels, C. W., 2008. Role of the Lysozyme inhibitor Ivy in growth or survival of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk, *Applied And Environmental Microbiology*, 74, 14, 4434–4439.
- Donlan, R. M. ve Costerton, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 167–193.
- Duru, İ. ve Saçaklı P., 2017. İmmun sistemin silahı: Antimikrobiyal peptidler-Bakteriyosinler. 4.Uluslararası Beyaz Et Kongresi Kongre Kitabı, 26-30 Nisan, 698-703, Antalya.
- Dusane, D. H., Lochab, V., Jones, T., Peters, C. W., Sindeldecker, D., Das, A., Roy, S., Sen, C. K., Subramaniam, V. V., Wozniak, D. J., Prakash, S. ve Stoodley, P., 2019. Electroceutical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Scientific Reports*, 9, 1, 1–13.
- Eagon, R. G. ve Jane Carson, K., 1965. Lysis of Cell Walls and Intact Cells of *Pseudomonas aeruginosa* by Ethylenediamine Tetraacetic Acid and by Lysozyme, *Canadian Journal of Microbiology*, 11, 2, 193-201.

- Echegoyen, Y. ve Nerín, C. 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers, *Food and Chemical Toxicology*, 62, 16–22.
- Eladawy, M., El-Mowafy, M., El-Sokkary, M. M. A. ve Barwa, R., 2020. Effects of Lysozyme, Proteinase K, and Cephalosporins on biofilm formation by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-9.
- EPA, 1991. Integrated Risk Information System (IRIS) Silver (CASRN 7440-22-4), Chemical Assessment Summary, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Eren, A. ve Baran, M. F., 2019. Fıstık (*Pistacia vera* L.) yaprağından gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi, *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6, 2, 165–173.
- Ergüllü, E. ve Üçüncü, M., 1982. Farklı sıcaklıklarda bırakılan çiğ sütlerde mikroorganizma sayısı bakımından ortaya çıkan değişimler, *Gıda*, 7, 3.
- Ernest, V., Gajalakshmi, S., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N., 2013. Enhanced activity of lysozyme-AgNP conjugate with synergic antibacterial effect without damaging the catalytic site of lysozyme, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology An International Journal*, 42, 5, 336-343.
- Fratini, F., Turchi, B., Pedonese, F., Pizzurro, F., Ragaglini, P., Torracca, B., Tozzi, B., Galiero, A. ve Nuvoloni, R., 2015. Does the addition of donkey milk inhibit the replication of pathogen microorganisms in goat milk at refrigerated condition?, *Dairy Science and Technology*, 96, 2, 243–250.
- Gurunathan, S., Lee, K. J., Kalishwaralal, K., Sheikpranbabu, S., Vaidyanathan, R. ve Eom, S. H., 2009. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles, *Biomaterials*, 30, 6341–6350.
- Gün, İ. ve Ekinçi, F. Y., 2009. Biyofilmler :yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam, *Gıda*, 34, 3, 165-173.
- Hallam, N. B., West, J. R., Forster, C. F. ve Simms, J., 2001. The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Research*, 35, 17, 4063–4071.
- Hancock, R. E. ve Lehrer, R., 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*, 16, 2, 82-88.
- Holah, J. T., Thorpe, R. H., 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials, *The Journal of Applied Bacteriology*, 69, 599–608.
- Hoş, A., 2010. Antibakteriyel nano gümüş katkılı polimer filmler, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Hou, X. ve Jones, B. T., 2000. Inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 9468–9485.

- Huang, H. W., 2000. Action of Antimicrobial Peptides: Two State Model. *Biochemistry*, 39, 29, 8347-8352.
- Hukiç, M., Seljmo,D., Ramoviç, A., Ibršimović, M. A., Doğan, S., Hukic, J. ve Bojic, E. F., 2018. The Effect of Lysozyme on Reducing Biofilms by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Gardnerella vaginalis*: An In Vitro Examination, *Mikrobial Drug Resistance*, 24, 4, 353-358.
- Ibrahim, H. R., 2003. Hen egg white lysozyme and ovotransferrin: mystery, structural role and antimicrobial function, In *Proceedings of the 10th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*, 1113-1128. France, September: Saint-Brieuc.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Juneja, L. R., Kim, M. ve Yamamoto, T., 1996. A Structural Phase of Heat-Denatured Lysozyme with Novel Antimicrobial Action, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 44, 1416 – 1423.
- Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T. ve Aoki, T., 2001a. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 506, 27–32.
- Ibrahim, H. R., Thomas, U. ve Pellegrini, A., 2001b. A Helix-Loop-Helix Peptide at the Upper Lip of the Active Site Cleft of Lysozyme Confers Potent Antimicrobial Activity with Membrane Permeabilization Action, *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 47, 43767–43774.
- Ibrahim, H. R., Aoki, T. ve Pellegrini, A., 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules, *Current pharmaceutical design*, 8, 9, 671-693.
- Iç, Y. T. ve Yıldırım, S., 2012. Çok kriterli karar verme yöntemleriyle birlikte taguchi yöntemini kullanarak bir ürünün tasarımının geliştirilmesi, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 27, 2, 447–458.
- Jain, N., Bhosale, P., Tale, V., Henry, R. ve Pawar, J., 2019. Hydrothermal assisted biological synthesis of silver nanoparticles by using honey and gomutra (cow urine) for qualitative determination of its antibacterial efficacy against *Pseudomonas* spp. isolated from contact lenses, *EurAsian Journal of BioSciences*, 13, 27–33.
- Kahyaoglu, M., 2008. Biyosüpfektanların antimikrobiyal aktiviteleri ve uygulama alanları, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24, 39–51.
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V. ve Gurunathan, S., 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, *Colloids Surfaces B; Biointerfaces*, 79, 2, 340–344.
- Kan, F. ve Küçükkurt, İ., 2018. Afyon manda kaymağı ve kaymakaltı sütlerinde bazı ağır metallerin ICP-MS ile araştırılması, *Kocatepe Veterinary Journal*, 11, 1–7.

- Karaca, B., 2018. Farklı çevresel koşulların süt ürünleri endüstrisinde sorun teşkil eden *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* biyofilmleri üzerine olan etkilerinin ve biyogiderim mekanizmalarının belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karakaş, Z., 2013. Çevresel kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* 'nın bazı virülans özelliklerinin ve antibiyotiklere karşı direncinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir.
- Kaya, T. ve Koser, H., 2012. Direct upstream motility in *Escherichia coli*, Biophysical Journal, 102, 7, 1514–1523.
- Khlyustova, A., Kirsch, M., Ma, X., Cheng, Y. ve Yang, R., 2022. Surfaces with antifouling-antimicrobial dual function via immobilization of lysozyme on zwitterionic polymer thin films, Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10, 2728–2739.
- Kılıç, T., Karaca, B. ve Çöleri Cihan, A., 2021. Abiyotik yüzeylerde termofilik *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127T suşunun biyofilm oluşumu ve polistiren yüzeyler üzerindeki biyofilm yapısının giderimi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Dergisi, 23, 2, 455–470.
- Kılınç, B. ve Sürengil, G., 2015. Identification of spoilage microorganisms in fresh trout fillets coated with silver antimicrobial edible film, Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 32, 4, 183–192.
- Kırmusaoğlu, S., 2017. Ortopedik implantlar üzerinde kolonize olan biyofilm üreten patojenler üzerinde bakırın bakterisidal ve antibiyofilm aktivitesi, Turkish Journal of Clinics and Laboratory, 9, 1, 13–18.
- Kıvak, T., 2014. Optimization of surface roughness and flank wear using the taguchi method in milling of hadfield steel with PVD and CVD coated inserts. Measurement, 50, 1, 19–28.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G. ve Lee, D. G., 2008. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*, BioMetals, 22, 2, 235–242.
- Klasen, H. J., 1999. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver, Burns, 26, 117–130.
- Koşarsoy, G., 2013. Mermer tozu ile hazırlanan nanokompozitlerin antimikrobiyal etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Köse, N., Asfuroğlu, Z. M., Köse, A., Şahintürk, V., Gürbüz, M. ve Doğan, A., 2021. Silver ion-doped calcium phosphate-based bone-graft substitute eliminates chronic osteomyelitis: an experimental study in animals, Journal of Orthopaedic Research, 39, 7, 1390-1401.
- Küçük, M. E. ve Kaplan, A., 2020. *Galleria mellonella*'nın bağışıklığı ile ilgili proteinler ve peptitler, Research Journal of BiologySciences, 13, 1, 38-45.

- Kwon, H. B., Lee, J. H., Lee, S. H., Lee, A. Y., Choi, J. S. ve Ahn, Y. S., 2009. A case of argyria following colloidal silver ingestion, *Annals of Dermatology*, 21, 3, 308–310.
- Leaper, D. J., 2006. Silver dressings: Their role in wound management, *International Wound Journal*, 3, 4, 282–294.
- Lee, S. H., O'Connor, J. T. ve Banerji, S. K., 1980. Biologically mediated corrosion and its effects on water quality in distribution systems, *Journal / American Water Works Association*, 72, 11, 636–645.
- Liu, Z., García-Díaz, B., Catacchio, B., Chiancone, E. ve Vogel, H. J., 2015. Protecting Gram-negative bacteria cell envelopes from human lysozyme: interactions with ivy inhibitor proteins from *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, 11, B, 3032-3046.
- Maçın, S., 2014. Pigmentli ve pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Mahmoud, M. ve El-Liethy, M. A., 2022. Three-dimensional, flow-through silver-magnetite nanocomposite-modified reactive electrochemical system with slow silver ions release for efficient bacterial disinfection of sewage, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 1, 106985.
- Maki, D. G., Cobb, L., Garman, J. K., Shapiro, J. M., Ringer, M. ve Helgersson, R. B., 1988. Attachable silver-impregnated cuff for infection prevention with central venous catheters: a prospective, randomized, multicenter study, *Amerikan Tıp Dergisi*, 85, 3, 307-314.
- Marchiore, N. G., Manso, I. J., Kaufmann, K. C., Lemes, G. F., Pizolli, A. P. de O., Droval, A. A., Bracht, L., Gonçalves, O. H. ve Leimann, F. V., 2017. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages, *LWT - Food Science and Technology*, 76, B, 203–208.
- Masschalck, B. ve Michiels, C. W., 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria, *Critical reviews in microbiology*, 29, 3, 191-214.
- Mataraci, E. ve Gerçeker, A. A., 2011. Çeşitli dezenfektanların minimum bakterisidal konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm kültürlerine karşı araştırılması, *Ankem Dergisi*, 25, 4, 209–214.
- Meesaragandla, B., Hayet, S., Fine, T., Janke, U., Chai, L. ve Delcea, M., 2022. Inhibitory Effect of Epigallocatechin Gallate-Silver Nanoparticles and Their Lysozyme Bioconjugates on Biofilm Formation and Cytotoxicity, *ACS Applied Bio Materials*, 5, 9, 4213–4221.
- Mijnendonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S. ve Van Houdt, R., 2013. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance, *BioMetals*, 26, 609–621.

- Mlalila, N. G., Swai, H. S., Hilonga, A. ve Kadam. D. M., 2017. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against *Escherichia coli*, *Nanotechnology, Science and Applications*, 10, 1–9.
- Modak, S. M. ve Fox, C. L., 1973. Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemical Pharmacology* 2002, 22, 19, 2391–2404.
- Moore, E. R. B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D. H., Ramos, J.L. ve Palleroni N.J., 2005. Nonmedical: *Pseudomonas*, *Prokaryotes* (2006), 6, 646–703.
- Mossel, D. A. A. ve Indacochea, L., 1971. A new cetrimide medium for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medical Microbiology*, 4, 3, 380–382.
- Nadworny P. L., Wang, J. F., Tredget, E. E. ve Burrell, R. E., 2008. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4, 241–251.
- Nguyen, R. C. L., Leclerc, J. E., Nantel, A., Dumas, P. ve Blanc, A. L., 1998. Argyremia in septal cauterization with silver nitrate, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 28, 4, 211–216.
- Nies, D. H., 1999. Microbial heavy-metal resistance, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 6, 730–750.
- O'Toole, G. A., 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay, *Journal of Visualized Experiments*, 1–2.
- Özcan, M. A., Gülüm, L., Midilli, M. ve Gören, M., 2018. The Using of Antimicrobial Peptides in Broiler Feeding, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7, 1, 1–6.
- Özdin, D., 2011. Ondansetron hidroklorür'ün transdermal iyontoforetik geçişinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Von Fellenberg, R. ve Wild, P., 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 180–187.
- Percival, S. L., Bowler, P. G. ve Russell, D., 2005. Bacterial resistance to silver in wound care, *Journal of Hospital Infection*, 60, 1–7.
- Prasher, P., Singh, M. ve Mudila, H., 2018. Oligodynamic effect of silver nanoparticles: a review, *BioNanoScience*, 8, 951–962.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. ve Jaziri, M. E., 2015. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms, *BioMed Research International*, 759348, 1–17.
- Rogers, J. V., Parkinson, C. V., Choi, Y. W., Speshock, J. L. ve Hussain, S. M., 2008. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation, *Nanoscale Research Letters*, 3, 4, 129–133.

- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. ve Hamood, A. N., 2004. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Medical Microbiology, 53, 841–853.
- Secinti, K. D., Ayten, M., Kahilogullari, G., Kaygusuz, G., Ugur, H. C. ve Attar, A., 2008. Antibacterial effects of electrically activated vertebral implants, Journal of Clinical Neuroscience, 15, 4, 434–439.
- Secinti, K. D., Ozgural, O., Tuna, H. ve Attar, A., 2009. Antibacterial and antifungal effects of weak direct current and silver ions, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 29, 3, 577-583.
- Seçinti, K. D., 2010. Gümüş anot uygulaması ve gümüş kaplı anti bakteriyel vertebra implantları, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- Sert, A., 2014. Bakteriyel biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik enzim bazlı kaplama yöntemlerinin geliştirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Servais, P., Laurent, P. ve Randon, G., 1995. Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems, Aqua London, 44, 1, 10–17.
- Sharma, B. P., Saha, A., Rahaman, L., Bhattacharjee, S. ve Tribedi, P., 2015. Silver Inhibits the Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*, Advances in Microbiology, 05, 677-685.
- Sırıken, B. ve Öz, V., 2017. *Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması, Gıda ve Yem Bilim. Teknoloji Dergisi, 52, 18, 42–52.
- Soliman, A. M., Elshorbagy, W., Maraqa, M. A., Al-Issai, L. M., El Sheikh, E. S., Elhaty, I. A., Ayesh, A. I. ve Pál, T., 2022. In-situ, facile and green preparation of nanoscale silver supported on activated carbon: Disinfection properties and removal of inorganic DBPs from drinking water, Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 17, 100621.
- Spadaro, J. A., 1985. Bone formation and bacterial inhibition with silver and other electrodes, Reconstruction surgery and traumatology, 19, 40–50.
- Sreekanth, T. V. M., Nagajyothi, P. C., Supraja, N. ve Prasad, T. N. V. K. V., 2015. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of phytogenic gold nanoparticles, Applied Nanoscience, 5, 595–602.
- Sriram, M. I., Kanth, S. B. M., Kalishwaralal, K. ve Gurunathan, S., 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model, International Journal of Nanomedicine, 5, 1, 753–762.
- Supraja, N., Prasad, T. N. V. K. V., Gandhi, A. D., Anbumani, D., Kavitha, P. ve Babujanathanam, R., 2018. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial efficacy and brine shrimp lethality assay of alstonia scholaris stem bark extract mediated ZnONPs, Biochemistry and Biophysics Reports, 14, 69–77.
- Şen, A. ve Halkman, A. K., 2006. Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar 1. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4, 2, 2-13.

- Tekin, A., 2010. Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Sağlık Çalışanlarında Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Taşıyıcılık Oranlarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Temel, A. ve Eraç, B., 2018. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 48, 1, 1–13.
- Terzi, H. A., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç mekanizmalarında aktif atım pompaları ve porin proteinlerinin etkisinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.
- Thekkae Padil, V. V. ve Černík, M., 2013. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application, International Journal of Nanomedicine, 8, 889–898.
- Toker, R. D., 2006. UV ışınları ile sertleşebilen aşınma ve yanma dayanımlı, nanokompozit kaplamaların hazırlanması ve antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- TSE 1018; 2002. TS 1018 Çiğ süt Standardı. Türk Standartlar Enstitüleri, Ankara.
- Tuncer, S. ve Akova, M., 1997. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları, Flora Dergisi, 1, 61–65.
- Turgut, B. C., 2016. Türkiye’de yayılış gösteren bazı ağaç türlerine ait uçucu yağların anti-biyofilm etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Türetgen, İ., 2005. Su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun incelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Türetgen, İ., 2006. Su Şebeke Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Tabakası, Tesisat Mühendisliği Dergisi, 92, 29-32.
- Türkcan, İ. ve Nalbant, A. D., 2015. Dental protetik materyallere mikroorganizma tutunumu, Atatürk Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Derg., 10, 10, 125–134.
- Tzika, E., Ferrara, D., Trelu, L. T. ve Barouti, N., 2015. Surinfection de plaie chronique par *Pseudomonas aeruginosa*, Rev Med Suisse, 11, 7, 68–72.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, 2014. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara.
- Uraz, G. ve Çıtak S., 1998. Çeşitli yörelerden sağlanan çiğ süt örneklerinden *Pseudomonas*’ların izolasyonu ve türlerinin dağılımları üzerine bir araştırma, Tr. J. of Agriculture and Forestry, 22, 469-474.
- Üstümkol, N., 2006. Farklı ortam koşullarında nisin, lizozim ve bazı bitkisel kaynakların küf gelişiminin kontrol altına alınması üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Watnick, P. ve Kolter, R., 2000. Biofilm, city of microbes, Journal Of Bacteriology, 182, 10, 2675–2679.
- Wellman, N., Fortun, S. M. ve McLeod, B. R., 1996. Bacterial biofilms and the bioelectric effect, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 9, 2012–2014.
- Yavuz, C., 2018. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin quorum sensing yönünden değerlendirilmesi ve epitel hücrelerindeki etkileri, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yılmaz, B. ve Tosun, H., 2013. Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların Gıda Sanayiinde Kullanımı, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 9, 1, 11–20.
- Young, P. C., Kloth, L. C. ve Laatsch-Lybeck, L. J., 1994. Antibacterial effects of a silver electrode carrying microamperage direct current in vitro, Journal of Clinical Electrophysiology, 6, 1, 14–18.
- URL-1 <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa>, Erişim tarihi: 06.11.2021.
- URL-2 <<https://www.news-medical.net/life-sciences/Quorum-Sensing-and-Pseudomonas-aeruginosa.aspx>>, Erişim tarihi: 06.12.2020.
- URL-3 <https://tr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa>, Erişim tarihi: 06.12.2020.
- URL-4 <<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel>>, Erişim tarihi: 15.11.2021.
- URL-5 <https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa>, Erişim tarihi: 06.12.2020.
- URL-6 <<https://www.slideserve.com/perry/pseudomonas>>, Erişim tarihi: 07.12.2020.
- URL-7 <<https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>>, Erişim tarihi: 07.12.2020.
- URL-8 <<https://microbiologylaboratoryturkey.blogspot.com/2018/09/katalaz-testi.html>>, Erişim tarihi: 08.01.2021.
- URL-9 <<https://www.proquest.com/dissertations-theses/metakrilik-asit-asilanmis-kitosan-kürelerin/docview/2583410214/se-2?accountid=38938>>, Erişim tarihi: 05.05.2022.
- URL-10 <<https://todnet.org/TODdata/files/arastirma-2019-yili-2.pdf>>, Erişim tarihi: 05.05.2022.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Sergül ÇİBİK

EĞİTİM BİLGİLERİ

Önlisans: Uludağ Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, 1996-1998.

Lisans: Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, İşletme Bölümü, 2009-2011.

Lisans: Aksaray Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2016-2019.

Yüksek Lisans: Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2020-2023.