



B. CEREBUS BİYOFİLMLEİNİN SİTRİK ASİT UYGULAMALARI İLE KONTROLÜ

Taner Şar, Meltem Yeşilçimen Akbaş*

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

Geliş / Received: 29.03.2018; Kabul / Accepted: 04.06.2018; Online baskı / Published online: 27.06.2018

Şar, T., Yeşilçimen Akbaş, M. (2018). *B. cereus* biyofilmlerinin sitrik asit uygulamaları ile kontrolü. GIDA (2018) 43 (4): 605-616 doi: 10.15237/gida.GD18041

Şar, T., Yeşilçimen Akbaş, M. (2018). *Control of B. cereus biofilms by citric acid treatments. GIDA (2018) 43 (4): 605-616 doi: 10.15237/gida.GD18041*

ÖZ

Bu çalışmada, önemli bir gıda patojeni olan *B. cereus* vejetatif hücrelerinin ve sporlarının mikrotitrasyon plaklarında, glukoz ve süt içeren besiyerleri kullanılarak (TSB_G ve TSB_S) oluşturduğu 24-72 saatlik biyofilmlerinin, %2 sitrik asit ve 200 ppm klor uygulamaları ile önlenmesi ve ortadan kaldırılması araştırılmıştır. *B. cereus* vejetatif hücrelerinin TSB_G ve TSB_S besiyerleri kullanıldığında oluşan biyofilmlerinin, sitrik asit uygulamaları ile %59 oranında önlendiği ve %38-63 oranlarında giderildiği belirlenmiştir. *B. cereus* spor biyofilmlerinin ise, %56 oranında önlenildiği ve %40-56 oranlarında giderilebildiği görülmüştür. Sitrik asit uygulamasının (%2) oluşan *B. cereus* vejetatif hücrelerinin ve sporlarının biyofilmleri üzerinde klor kadar etkili olabildiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *B. cereus*, biyofilm önlenmesi, biyofilm ortadan kaldırılması, sitrik asit, *B. cereus* sporları

CONTROL OF *B. CEREBUS* BIOFILMS BY CITRIC ACID TREATMENTS

ABSTRACT

In this work, the prevention and removal of biofilm formations of *B. cereus* vegetative cells and spore formations by citric acid (2%) and chlorine (200 ppm) treatments on microtitration plates were investigated. The biofilms were produced in the presence of glucose and milk (TSB_G and TSB_M) for 24-72 hours. *B. cereus* biofilms, formed by vegetative cells in TSB_G and TSB_M were inhibited by citric acid treatments by up to 59% and removed about 38-63%, respectively. However, biofilms of *B. cereus* spores were prevented about 56% and removed by 40-56%. It was shown that citric acid treatment (2%) could be as effective as chlorine treatment for biofilms of *B. cereus* vegetative cells and spores.

Keywords: *B. cereus*, prevention of biofilm, removal of biofilm, citric acid, spores of *B. cereus*

*Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉ akbasam@gtu.edu.tr

☎ (+90) 262 605 2530

☎ (+90) 262 605 2505

GİRİŞ

Bacillus sp. süt ve süt ürünleri, pirinç ve pirinç ile ilgili gıdalar, et ve et ürünleri, çorba ve baharat gibi ürünlerden sıklıkla izole edilebilen ve spor oluşturabilen bakteri cinsidir (Te Giffel vd., 1996; Organji vd., 2015; Grutsch vd., 2018). Özellikle *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* türleri gıdaların kalitesini etkilemesinden ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilmelerinden dolayı gıda endüstrisinde sorun yaratan önemli patojen bakterilerdendir (Bennett ve Belay, 2001; Faille vd., 2001; Simões vd., 2010; Lücking vd., 2013). Bakterilerin spor formları, vejetatif formlarına göre ısı işlem ve dezenfektanlara karşı daha dayanıklıdır (Granum ve Lund, 1997; Carlin vd., 2010). Bu özelliklerinden dolayı sporlar, gıda ve gıda ile ilgili yüzeylerde uzun süre kalabilmektedirler (Kreske vd., 2006; Ryu ve Beuchat, 2005). Ayrıca, sporların fizyolojik özellikleri nedeniyle vejetatif hücrelere göre daha fazla biyofilm oluşturma potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir (Pagedar ve Singh, 2012).

Biyofilmler, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Escherichia* gibi çeşitli bakterilerin ekzopolisakkaritler (EPS) üreterek yüzeyler üzerine tutunmaları ile oluşmaktadır (Austin ve Berferin, 1995; Oulahal vd., 2008; Abee vd., 2011; Corcoran vd., 2014). Gıda endüstrisinde oluşan biyofilm yapıları protein ve kalsiyum fosfat gibi süt kalıntılarını içerebilmektedir (Flint vd., 1997; Mittelman, 1998; Flemming vd., 2000; Koutina ve Skibsted, 2015).

Bacillus cinsi bakteriler (özellikle *B. cereus*) gıda ile ilişkili yüzeylere tutunabilir ve bu ortamlara tutunarak proteaz ve lipaz gibi enzimler üretebilmektedir. Böylece, gıda ürünleri ve gıda işleme ekipmanları kontamine olabilir ve süt ürünlerinin bozulmasına neden olabilmektedir (Lindsay vd., 2000). Ayrıca, çiğ süt örneklerinden izole edilen *B. cereus* izolatlarının bazı antibiyotiklere (penisilin, ampisilin, amoksisilin ve aefoksitin) karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir (Abraha vd., 2017). Sporulasyon süt endüstrisi gibi pek çok gıda endüstrisinde önemli bir olaydır. Sporlar süt üretim sürecinde kimyasal işlemler ve pastörizasyon gibi ısı işlemlere karşı dirençlidirler. Sporların ortamda bulunması ve bir yüzeye

tutunması biyofilm oluşumunun önemli bir başlatıcısı olabilmektedir (Flint vd., 1997; Parkar vd., 2001). Ayrıca, sporlar uygun koşullar altında vejetatif hücre formuna dönebilir ve biyofilm oluşumuna dahil olabilirler (Parkar vd., 2001).

Süt endüstrisinde biyofilm oluşumu, süt ürünlerinin bozulmasına bağlı olarak ekonomik kayıplara ve hijyen sorunlarına neden olabilmektedir (Bremer vd., 2006). Biyofilm kontrolü için gıda endüstrisinde genellikle klorlu bileşikler ve perasetik asit kullanılmaktadır (Sánchez vd., 2015). Endüstride kullanılan bu bileşikler sudaki organik maddeleri oksitleyerek kanserojenik trihalometanları ve haloasetik asitleri oluşturabilmektedir (Sadiq ve Rodriguez, 2004; Gómez-López vd., 2013; Van Haute vd., 2013; Waters ve Hung, 2014).

Organik asitler, “Genel Olarak Güvenilir” (GRAS) kabul edilen ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bileşiklerdir (US FDA, United States Food and Drug Administration). Bu nedenle biyofilm kontrolünde organik asitlerin (özellikle sitrik asit) alternatif olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir (Ntrouka vd., 2011; Faot vd., 2014; Akbas ve Kokumer, 2015; Akbas ve Cag, 2016).

Yapılan bu çalışmada, *B. cereus* vejetatif hücreleri ve sporları ile biyofilm oluşumu glukoz ve süt içeren besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumunun önlenmesi ve oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için, %2 sitrik asit uygulaması 200 ppm klor uygulaması ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bakteri suşları

Bu çalışmada biyofilm oluşumunun incelenmesi için *B. cereus* ATCC 11778 suşu kullanılmıştır.

B. cereus spor oluşumu

Spor oluşumu için, *B. cereus* ATCC 11778 suşu, LB besiyeri (Luria Broth) içerisine inoküle edilerek 30°C'de bir gece boyunca çalkalamalı bir inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, 500 µL bakteri kültüründen alınarak dekstroz (500 ppm) ve MnSO₄.H₂O (3 ppm) ile

zenginleştirilmiş Nutrient Agar ekim yapılarak 7 gün boyunca 30°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir (López vd., 1996). İnkübasyondan sonra, petri üzerinden bir öze yardımı ile alınan kültür 10 mL steril distile su ile karıştırılmış ve hazırlanan süspansiyon cam elyaf kullanılarak süzümüştür. Elde edilen süzüntüdeki vejetatif hücreleri elimine etmek için, süzüntü 80°C'de 10 dakika süre ile ısıtılmıştır. Spor sayısı, spor süspansiyonunun ısıtılmadan önce ve ısıtıldıktan sonraki seri dilüsyonlarının hazırlanarak Nutrient Agar besiyerine yayma plak yöntemi ile ekimlerinin yapılması ve 30°C sıcaklıkta 24-48 saat inkübasyonu ile belirlenmiştir. Spor süspansiyonu +4°C'de en fazla 30 gün süre ile saklanmıştır.

Spor oluşumu Schaeffer-Fulton yöntemi ile tespit edilmiştir (Schaeffer ve Fulton, 1933). Bu yöntemde, 10 µL spor süspansiyonu lam üzerine yayılmış, alevden geçirilerek fikse edilmiş ve daha sonra preparat üzerine 1 mL %0.5 (a/h) malaşit yeşili ilave edilerek preparat 5 dakika alttan ısıtılarak boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Durulamadan sonra numune, %1 (a/h) safranin ile boyanmıştır. Sporulasyon ışık mikroskopu altında incelenmiş ve sporlar yeşil renkli vejetatif hücreler ise kırmızı renkli olarak belirlenmiştir.

Bakteri kültürü ve biyofilm oluşum koşulları

Biyofilm çalışmalarında bakteri büyüme besiyeri olarak %2 (a/h) D-glukoz veya %10 (h/h) süt ile zenginleştirilmiş Triptik Soy Broth (TSB_G ve TSB_S) kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu 96 kuyulu polistren mikrotitrasyon plağı kullanılarak belirlenmiştir (Akbas ve Kokumer, 2015). Biyofilm oluşumunun tespiti için, *B. cereus* vejetatif hücreleri bir gece boyunca 30°C'de TSB_G'de büyütülmüştür. İnkübasyondan sonra vejetatif hücre kültürü ve spor süspansiyonu, taze TSB_G veya TSB_S besiyerleri içerisinde 1:200 oranında (başlangıç hücre veya spor konsantrasyonu yaklaşık 10⁵ kob/mL) olacak şekilde hazırlanmıştır. *B. cereus* vejetatif hücrelerini veya sporlarını içeren ve TSB_G veya TSB_S besiyerleri içerisinde hazırlanan bu kültürlerden, 150 µL alınarak 96 kuyulu polistren mikrotitrasyon plağı kuyuları içerisine

aktarılmıştır. Mikrotitrasyon plağı kuyularında bakteri içeren kültürler 24, 48 ve 72 saat, spor içeren kültürler ise 72 saat süreler ile 30°C'de inkübe edilmiştir. Bakteri veya spor süspansiyonu bulunmayan besiyerleri (TSB_G ve TSB_S) ise kör olarak kullanılmıştır.

İnkübasyondan sonra, *B. cereus* kültürleri uzaklaştırılmış ve kuyular distile su ile yıkanmıştır. Polistren yüzeylere tutunan hücreler veya sporlar, 150 µL (%0.5, a/h) kristal viyole solüsyonu ile 20 dakika boyunca muamele edilmiş, daha sonra kristal viyole solüsyonu uzaklaştırılarak distile su ile yıkanmıştır. Biyofilm oluşturan hücreler veya sporlar tarafından tutulan boya 150 µL glasiyal asetik asit (%33, h/h; Merck) ile 10 dakika süreyle bekletilerek boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Mikrotitrasyon plaklarındaki biyofilm oluşumları 570 nm'de bir mikrotitrasyon plağı okuyucusu (BMG Labtech Fluostar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir (Stepanović vd., 2000).

Biyofilm kontrolünde sitrik asit uygulaması

Biyofilm oluşumunun önlenmesi için, 96 kuyulu polistren mikrotitrasyon plağı kuyuları 20 dakika süreyle sitrik asit (%2, a/h) veya klor (200 ppm) ile bekletilmiş ve sonra mikrotitrasyon plakları ters çevrilerek 30 dakika süre ile oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, biyofilm oluşumu (yukarıda anlatıldığı gibi) gerçekleştirilmiştir. Bakteri veya spor inokülasyonu yapılmamış besiyerleri (TSB_G ve TSB_S) kör olarak kullanılmıştır.

Oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için ise öncelikle biyofilm oluşumu gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumu için inkübasyon sonrası, kültür ortamları uzaklaştırılmış ve kuyular distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra, mikrotitrasyon kuyuları sitrik asit (%2, a/h) veya klor (200 ppm) ile farklı sürelerle (5, 10 ve 20 dakika) muamele edilmiştir. Uygulama sonrası, kuyular 150 µL %0.5 (a/h) kristal viyole ile 20 dakika boyunca bekletilmiş ve boya ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ardından, mikrotitrasyon plakları 150 µL glasiyal asetik asit (%33, h/h; Merck) ile 10 dakika süre ile bekletilmiş ve boyanın tekrar çözünür hale gelmesi sağlanmıştır. Bakteri veya spor

süspansiyonu bulunmayan besiyerleri (TSB_G ve TSB_S) kör olarak kullanılmıştır. Biyofilm oluşumları 570 nm'de bir mikrotitrasyon plağı okuyucusu (BMG Labtech Fluostar Omega ELISA, Offenburg, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir (Stepanović vd., 2000).

Sitrik asit ve aktif klorun antibiyofilm etkileri (%):

Biyofilm oluşumunun engellenmesi ve ortadan kaldırılmasındaki azalma oranları aşağıda belirtilen formüle göre belirlenmiştir (Pitts vd., 2003).

Biyofilm oluşumunun azalma oranı (%) = $\frac{[(C-B) - (T-B)]}{(C-B)} \times 100$

B kör olarak kullanılan kuyulardaki ortalama absorbans değeri, C biyofilm oluşan kuyulardaki ortalama absorbans değeri, T ise sitrik asit veya klor uygulanan kuyulardaki ortalama absorbans değeridir.

İstatistiksel analiz

Tüm analizler en az üç kez tekrar edilmiştir. İstatistiksel analizde Student's t-testi kullanılmıştır. *P* değerinin 0.05'den küçük olan değerler istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

***B. cereus* vejetatif hücrelerinin biyofilmlerinin kontrolü**

Klor ve sitrik asit uygulamaları ile B. cereus biyofilmlerinin önlenmesi

Klor uygulaması (200 ppm) ile, *B. cereus* vejetatif hücrelerinin biyofilm oluşumunun TSB_G besiyeri içeren mikrotitrasyon plaklarında %63-67 (*p* <0.05) oranında ve TSB_S besiyeri içeren mikrotitrasyon plaklarında %52-59 (*p* <0.05) arasında önlendiği belirlenmiştir (Şekil 1). Biyofilm oluşumunun önlenmesinde, 5-20 dakika sürelerle, %2 (a/h) konsantrasyonda sitrik asit uygulaması ile ise her iki besiyerinde de biyofilmlerin %56-59 arasında (*P* <0.05) olacak şekilde önlendiği belirlenmiştir (Şekil 2).

Klor ve sitrik asit uygulamaları ile B. cereus biyofilmlerinin ortadan kaldırılması

TSB_G içeren mikrotitrasyon plaklarında oluşan *B. cereus* biyofilmlerin, klor uygulamaları (200 ppm, 5-20 dakika sürelerle) ile %38-61 (*p* <0.05) oranında

ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir (Şekil 1 (a)). Benzer şekilde, klor uygulamaları ile TSB_S besiyeri kullanıldığında oluşan biyofilmlerin %42-64 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 1 (b)).

TSB_G kullanıldığında oluşan *B. cereus* biyofilmlerin, 5 dakika süre ile sitrik asit (%2, a/h) uygulaması ile %52-58 oranında ortadan kaldırıldığı (*P* <0.05) belirlenmiştir. Aynı sitrik asit konsantrasyonunun 10 dakika süre ile uygulanması ile oluşan biyofilmlerin %55-61 (*p* >0.05) oranında, 20 dakika süre ile uygulanmasında ise %57-63 (*P* <0.05) oranında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir (Şekil 2 (a)). TSB_S kullanıldığında oluşan *B. cereus* biyofilmlerinin ortadan kaldırılmasında, 5 ve 10 dakika süre ile sitrik asit uygulamasının sırasıyla %38-42 ve %50-56 (*P* <0.05) azaltıcı etkileri olduğu belirlenmiştir. Aynı ortamda 72 saat süre ile oluşan *B. cereus* biyofilmlerinin 20 dakika süre ile sitrik asit uygulaması ile ise %54-63 (*p* <0.05) oranında olacak şekilde önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2 (b)).

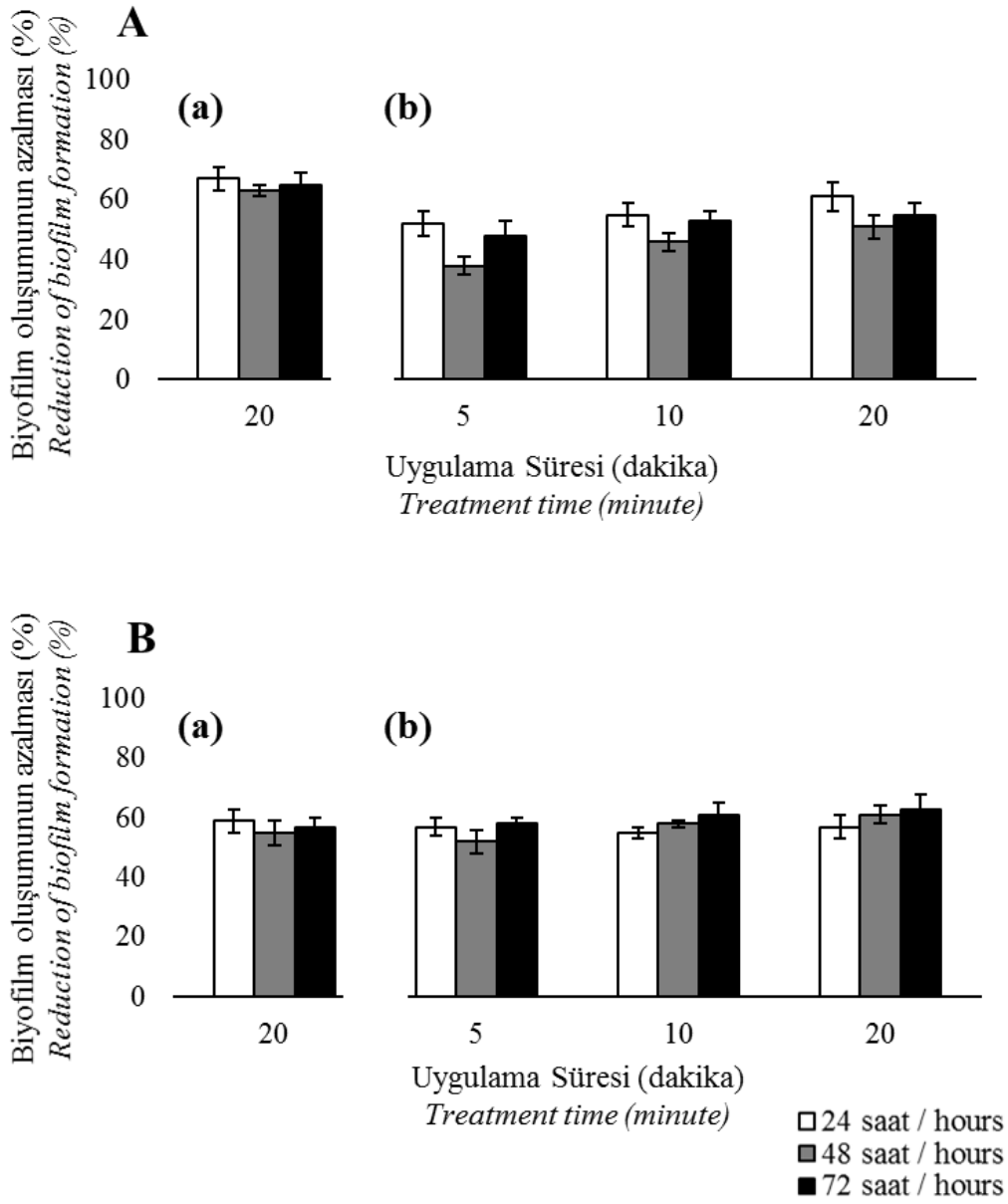
***B. cereus* sporlarının biyofilmlerinin kontrolü**

Klor ve sitrik asit uygulamaları ile B. cereus spor biyofilmlerinin önlenmesi

B. cereus sporları tarafından TSB_G ve TSB_S besiyerleri kullanıldığında 72 saat sonunda oluşan biyofilmlerin klor uygulamaları ile sırasıyla %58 ve %56 (*P* <0.05) oranlarında engellendiği belirlenmiştir. Sitrik asit (%2, a/h) uygulamaları ile ise, *B. cereus* sporlarının TSB_G ve TSB_S besiyerleri kullanıldığında oluşan biyofilmlerinin, yine sırasıyla %56 ve %52 (*P* <0.05) oranında engellendiği tespit edilmiştir (Şekil 3).

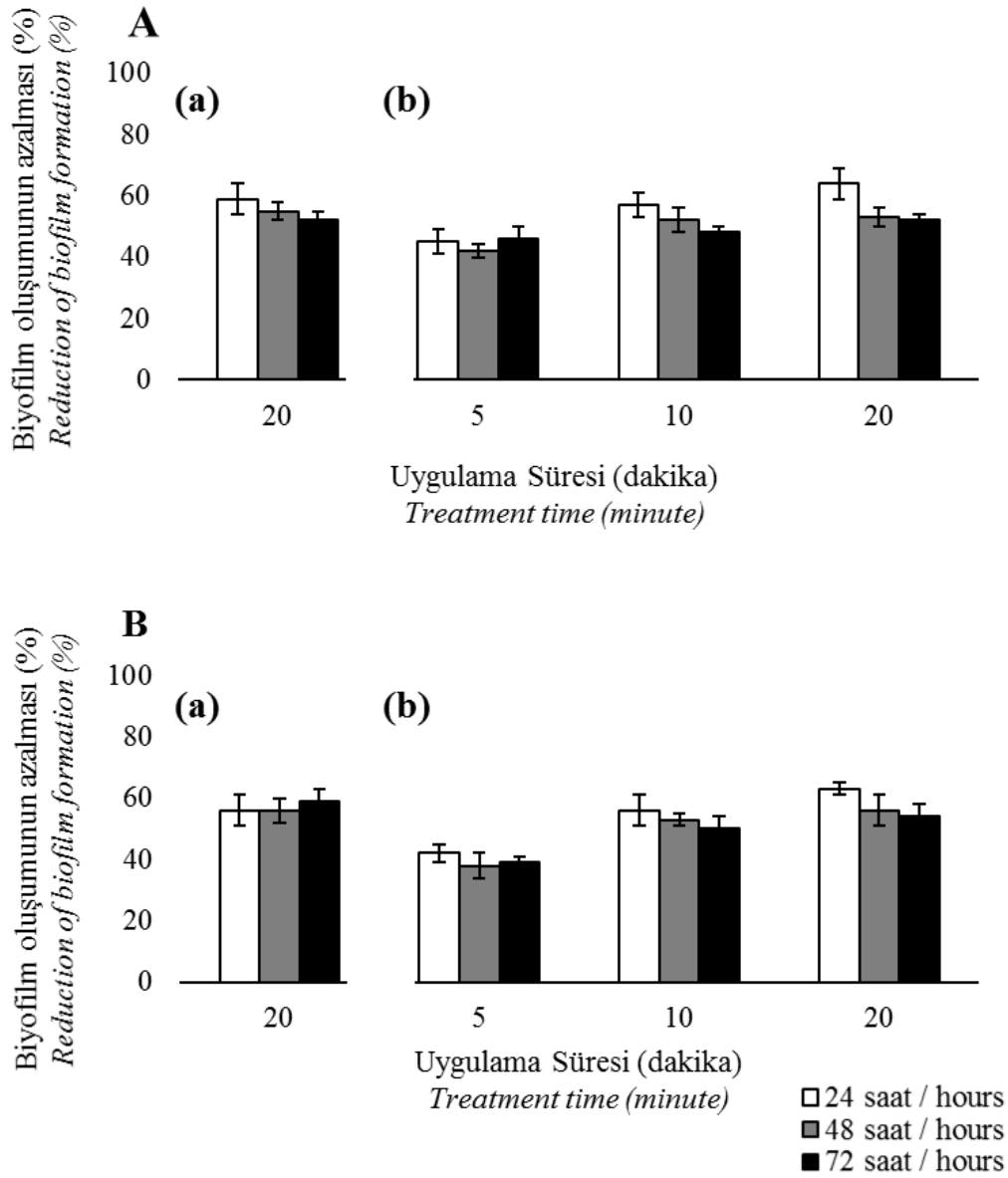
Klor ve sitrik asit uygulamaları ile B. cereus spor biyofilmlerinin ortadan kaldırılması

Her iki besiyeri kullanıldığında da *B. cereus* sporlarının oluşturduğu 72 saatlik biyofilmlerin, klor uygulamaları (farklı sürelerde; 5, 10 ve 20 dakika) ile %47-59 oranında ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir (Şekil 3). Oluşan biyofilm yapısının sitrik asit muamelesi ile, TSB_G besiyerini içeren mikroplaklarda yaklaşık %44-56 oranında, TSB_S besiyerini içeren mikroplaklarda ise %40-52 oranlarında ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 1. *B. cereus* vejetatif hücrelerinin TSB_G (A) ve TSB_S (B) besiyerlerini içeren mikrotitrasyon plaklarında oluşturduğu 24, 48 ve 72 saatlik biyofilmlerin klor (200 ppm) uygulaması ile önlenmesi (a) ve ortadan kaldırılması (b) oranları (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Figure 1. Prevention (a) and removal (b) ratios (%) of 24, 48 and 72 hour *B. cereus* biofilms formed by vegetative cells in TSB_G (A) and TSB_M (B) media containing microtiter plates with chlorine treatments (200 ppm). Values are averages of at least three independent determinations. Error bars represent standard deviations.



Şekil 2. *B. cereus* vejetatif hücrelerinin TSB_G (A) ve TSB_S (B) besiyerlerini içeren mikrotitrasyon plaklarında oluşturduğu 24, 48 ve 72 saatlik biyofilmlerin sitrik asit (%2, a/h) uygulaması ile önlenmesi (a) ve ortadan kaldırılması (b) oranları (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

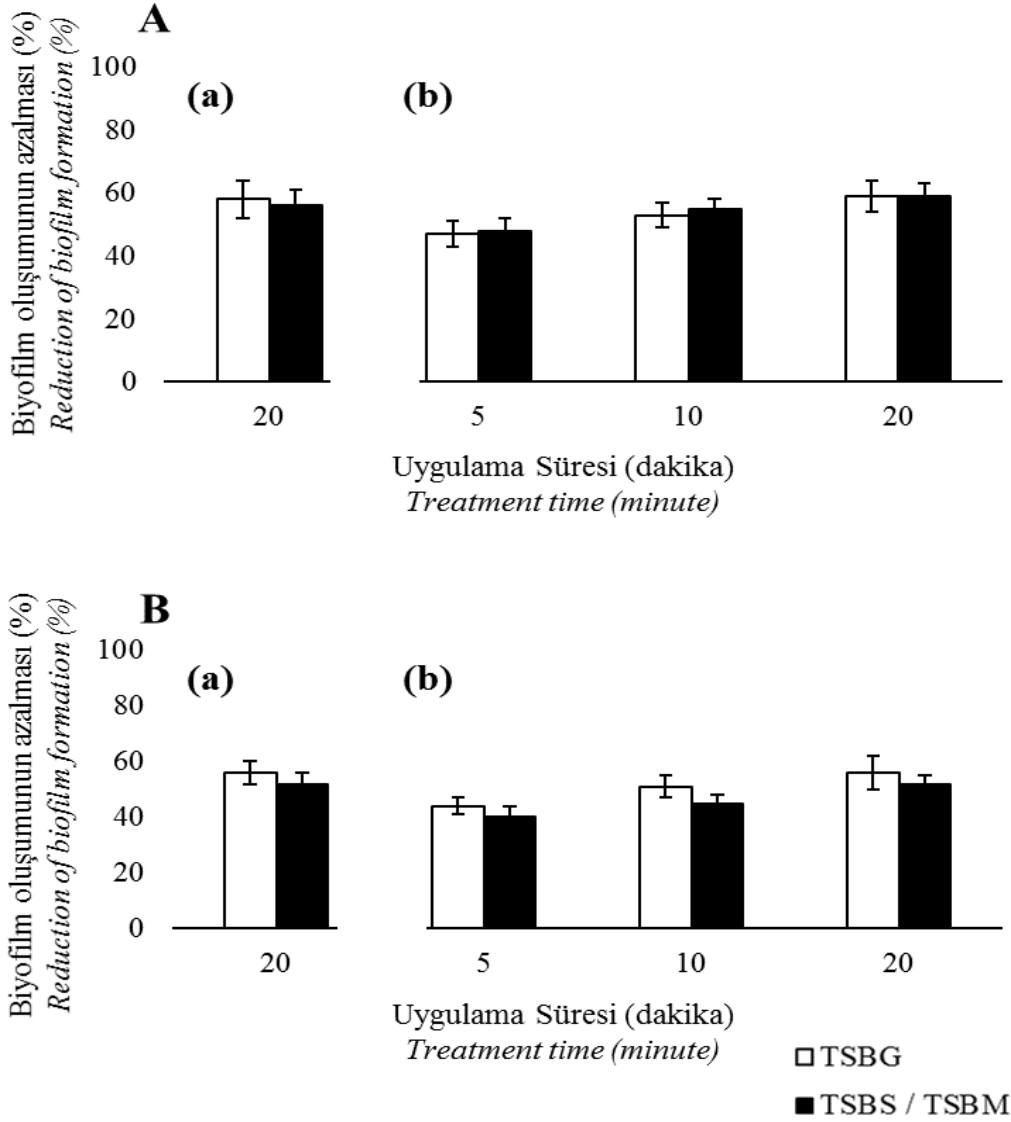
Figure 2. Prevention (a) and removal (b) ratios (%) of 24, 48 and 72 hour *B. cereus* biofilms formed by vegetative cells in TSB_G (A) and TSB_M (B) media containing microtiter plates with citric acid treatments (2%, w/v). Values are averages of at least three independent determinations. Error bars represent standard deviations.

Bu çalışmada, TSB_G ve TSB_S besiyerlerini içeren mikrotitrasyon plaklarında *B. cereus* vejetatif hücreleri ve sporları ile biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılmasında sitrik asit

uygulamasının etkileri, klor uygulaması ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunun önlenmesi için, biyofilm oluşumu öncesi, 96 kuyulu mikropoplaklara %2 sitrik asit veya

200 ppm klor solüsyonu ilave edilerek 20 dakika süre ile bekletilmiştir. Oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için ise, biyofilm oluşumunun

gerçekleştiği mikrotitrasyon plakları %2 sitrik asit veya 200 ppm klor solüsyonu ile 5, 10 ve 20 dakika süreler ile muamele edilmiştir.



Şekil 3. *B. cereus* sporlarının TSB_G ve TSB_S besiyerlerini içeren mikrotitrasyon plaklarında oluşturduğu 72 saatlik biyofilmlerin klor (A) ve sitrik asit (%2, a/h) (B) uygulamaları ile önlenme (a) ve ortadan kaldırılma (b) oranları (%). Her değer en az üç tekrarin ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

Figure 3. Prevention (a) and removal (b) ratios (%) of 24, 48 and 72 hour *B. cereus* biofilms formed by spore formations in TSB_G and TSB_M media containing microtiter plates with chlorine (A) and citric acid (B) (2%, w/v) treatments. Values are averages of at least three independent determinations. Error bars represent standard deviations.

B. cereus vejetatif hücrelerinin biyofilm oluşumunun inkübasyon süresinin artması ile arttığı tespit edilmiştir. *B. cereus* spor biyofilmlerinin oluşumunun ise, ilk 48 saatte 570 nm'deki absorban değerlerine göre çok az olduğu görülmüştür. Bu nedenle, *B. cereus* spor biyofilmlerinin oluşumu için 72 saatlik inkübasyon süresi kullanılmıştır. Ayrıca, polistren mikrotitrasyon plaklarında, *B. cereus* sporlarının, TSB_G ve TSB_S besiyerleri ile 72 saatlik inkübasyonları sonunda, 570 nm'deki absorban değerlerine göre, vejetatif hücrelerden daha fazla biyofilm (%10) oluşturduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin biyofilm oluşturulan yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik özellikte olması ve bakterilerin/sporların sahip olduğu yüzey yapılarının özellikleri olduğu rapor edilmiştir (Williams ve Fletcher, 1996; Marques vd., 2007; Elhariry, 2011).

Biyofilm oluşumunun besiyeri bileşenleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, TSB_S besiyeri kullanıldığında biyofilm oluşumunun, TSB_G besiyeri kullanıldığında göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Besiyerinde süt bileşenlerinin varlığının mikroorganizmaların yüzeye tutunmasında kolaylık sağladığı düşünülebilir. Bu ortamlarda oluşan biyofilm yapısı ve bileşimi hakkında bilgiler sınırlı olup biyofilm oluşumunu önlemek için uygulanan stratejiler çok başarılı olmamıştır (Burgess vd., 2010; Marchand vd., 2012). Ayrıca TSB_G ve TSB_S besiyerleri kullanıldığında, biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılması oranları birbirine yakın bulunmuştur. Bu da besiyerine glukoz ilavesinin gıda işleme sanayisi ortamlarını yansıtabileceğini göstermektedir.

B. cereus vejetatif hücreleri ve sporları ile biyofilm oluşumunun klor ve sitrik asit uygulamaları ile önlenmesi ve ortadan kaldırılması oranlarının, uygulama süresine bağlı olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, %2 oranında sitrik asit uygulamasının zamana bağlı olarak *B. cereus* vejetatif hücrelerinin ve sporlarının biyofilm oluşumunu klor kadar etkin bir şekilde önlediği ve ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Ayrıca vejetatif hücrelerin biyofilm yaşı arttıkça, özellikle 72 saatlik biyofilm oluşumlarının, sitrik asit veya klor uygulamaları ile

daha az oranlarda önlenebildiği ve ortadan kaldırıldığı görülmüştür.

Biyofilm kontrolü için genellikle sodyum hipokloritli solüsyonlar kullanılmaktadır (Ryu vd., 2005). Klor membran proteinleri ve lipidler ile reaksiyona girerek, membran geçirgenliğini artırır (Noss vd., 1983; Ghandbari vd., 1983; Virto vd., 2005). Klorlu solüsyonların karsinojenik bileşiklerin oluşmasına sebep olması ve kalıntı bırakmasından dolayı, biyofilm oluşumunun kontrolünde biyogüvenilir potansiyel yeni uygulamalara olan ilgi artmaktadır (Sánchez vd., 2015). Organik asitler ise pH düşürme, hücre membranı transport sistemini bozması, makromoleküllerin sentezini önlemesi ve DNA denatürasyonuna etki etmesi nedeniyle bakteriler üzerinde engelleyici etki gösterirler (Ricke 2003, Neal-McKinney vd., 2012; Ramos-Villaruel vd., 2015). Son zamanlarda, pek çok araştırmacı biyofilm kontrolü için organik asitlerin etkisini incelemişlerdir (Almasoud vd., 2015; Almasoud vd., 2016; Zhang vd., 2017). Ntrouka ve arkadaşları (2011) sitrik asit solüsyonunun *Streptococcus mutans* ve karışık kültür biyofilmlerine karşı etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Faot ve arkadaşları (2014) sitrik asitin *C. albicans* biyofilm oluşumunu ve hücre canlılığını azalttığını bildirmişlerdir. Akbaş ve Kokumer (2015) ise *S. aureus* izolatları ile biyofilm oluşumunda perasetik asite kıyasla sitrik asitin etkin olabileceğini ve alternatif dezenfektan olabileceğini bildirmişlerdir. Sitrik asit dışında, malik asit gibi diğer organik asitlerin de biyofilm kontrolünde etkili olarak kullanılabilirliği farklı çalışmalar ile tespit edilmiştir. (Akbaş ve Çağ, 2015; Almasoud vd., 2015). Ayrıca organik asitler gibi bazı fenolik asitlerin de (ferulik ve salisilik asit) bakterilerin yüzey yükünü arttırdığı, hareketini kısıtladığı ve fizikokimyasal yüzey özelliklerini etkilediği belirlenmiş ve biyofilm oluşumunun kontrolünde doğal antibiyofilm ajanları olarak değerlendirilebilecekleri gösterilmiştir (Lemos vd., 2014). Yapılan bu çalışma ile gıda sanayisi ile ilişkili olabilen *B. cereus* suşunun hem vejetatif hem de sporlarının biyofilm oluşumlarında sitrik asitin doğal bir antibiyofilm ajan olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda, glukoz ve süt içeren besiyerleri kullanılarak (TSB_G ve TSB_S) *B. cereus* bakterisinin vejetatif hücreleri ve sporları ile oluşturulan biyofilmlerin önlenmesi ve ortadan kaldırılmasında sitrik asit uygulamalarının klor uygulamaları kadar etkili olduğu belirlenmiştir. *B. cereus* vejetatif hücrelerinin biyofilmlerinin, sitrik asit uygulamaları ile TSB_G ve TSB_S besiyerleri kullanıldığında, %59 oranında önlendiği ve %38-63 oranlarında giderildiği gösterilmiştir. *B. cereus* spor biyofilmlerinin ise sitrik asit uygulamaları ile %56 oranlarında önlenebildiği ve %40-56 oranlarında giderilebildiği tespit edilmiştir. Biyofilm kontrolü için sitrik asit uygulaması etkili ve alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Yapılabilecek sonraki çalışmalarda farklı organik asitlerin *B. cereus* biyofilmleri üzerindeki etkileri araştırılabilir. Ayrıca, gıda işleme endüstrisinde kullanılan paslanmaz çelik gibi farklı yüzeylerde de sitrik asit uygulamasının oluşan *B. cereus* biyofilmlerinin kontrolündeki etkisi incelenebilir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar özellikle *B. cereus* gibi spor oluşturan gıda patojenlerinin sorun olduğu biyofilmlerin kontrolünde sitrik asidin kullanılabilirliğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gebze Teknik Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abee, T., Kovács, Á.T., Kuipers, O.P., Van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 22(2): 172-179.

Abraha, A., Bikila, T., Alemu, S., Muktar, Y. (2017). *Bacillus cereus* isolation and load from raw cow milk sold in Markets of Haramaya District, eastern Ethiopia. *Int. J. Food Contam*, 4(1): 15.

Akbas, M.Y., Cag, S. (2016). Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *RVCTA*, 22(7): 587-597.

Akbas, M.Y., Kokumer, T. (2015). The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk

samples by citric acid treatments. *Int J Food Sci Technol*, 50(7): 1666-1672.

Almasoud, A., Hettiarachchy, N., Rayaprolu, S., Babu, D., Kwon, Y.M., Mauromoustakos, A. (2016). Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. *LWT-Food Sci Technol*, 66: 560-564.

Almasoud, A., Hettiarachchy, N., Rayaprolu, S., Horax, R., Eswaranandam, S. (2015). Electrostatic spraying of organic acids on biofilms formed by *E. coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh produce. *Food Res Int.*, 78: 27-33.

Austin, J.W., Berferin, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J Dairy Res.*, 62: 509-519.

Bennet, R.W., Belay, N. (2001). *Bacillus cereus*. In Compendium of methods for the microbiological examination of food, Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), 4th edition, American Public Health Association, Washington, DC, Chapter 32, pp. 311-316.

Bremer, P.J., Fillery, S., McQuillan, A.J. (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol*, 106(3): 254-262.

Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int J Food Microbiol*, 144(2): 215-225.

Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretiere, M.H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-The, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.*, 43(7): 1885-1894.

Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican, M. (2014). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microbiol*, 80: 1507-1514.

- Elhariry, H.M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol.*, 28(7): 1266-1274.
- Faillle, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., Guerardel, Y. (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: consequences on their ability to adhere to stainless steel. *Int J Food Microbiol*, 143(3): 125-135.
- Faot, F., Cavalcanti, Y.W., e Bertolini, M.D.M., de Rezende Pinto, L., da Silva, W.J., Cury, A.A.D.B. (2014). Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly (methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health*, 14(1): 77.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Mayer, C., Korstgens, V., Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In *Symposia-Society for General Microbiology*, Cambridge; Cambridge University Press, pp. 87-106.
- Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1): 81-97.
- Ghandbari, E.H. (1983). Reactions of Chlorine and Chlorine Dioxide with Free Fatty Acids, Fatty Acid Esters, and Triglycerides. In *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 4 (Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cotruvo, J.A., Cumming, R.B., Mattice, J.S., Jacobs, V.A., Eds.). Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor. Mich, 167-180.
- Gómez-López, V.M., Marín, A., Medina-Martínez, M.S., Gil, M.I., Allende, A. (2013). Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. *Postharvest Biol Technol.*, 85: 210-217.
- Granum, P.E., Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 157(2), 223-228.
- Grutsch, A.A., Nimmer, P.S., Pittsley, R.H., McKillip, J.L. (2018). *Bacillus* spp. as Pathogens in the Dairy Industry. *Foodborne Diseases*, 193-211.
- Koutina, G., Skibsted, L.H. (2015). Calcium and phosphorus equilibria during acidification of skim milk at elevated temperature. *Int Dairy J.*, 45: 1-7.
- Kreske, A.C., Ryu, J.H., Pettigrew, C.A., Beuchat, L.R. (2006). Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. *J Food Prot*, 69(11): 2621-2634.
- Lemos, M., Borges, A., Teodósio, J., Araújo, P., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. (2014). The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single-and dual-species biofilms. *Int Biodeterior Biodegradation*, 86: 42-51.
- Lindsay, D., Brözel, V.S., Mostert, J.F., Von Holy, A. (2000). Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. *Int J Food Microbiol.*, 54(1): 49-62.
- López, M., González, I., Condón, S., Bernardo, A. (1996). Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int J Food Microbiol.*, 28(3): 405-410.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int J Food Microbiol.*, 166(2): 270-279.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 11(2): 133-147.
- Marques, S.C., Rezende, J.G.O.S., Alves, L.A.F., Silva, B.C, Alves, E., Abreu, L.R., Piccoli, R.H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol*, 38: 538-543.

- Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci.*, 8(10), 2760-2764.
- Neal-McKinney, J.M., Lu, X., Duong, T., Larson, C.L., Call, D.R., Shah, D.H., Konkel, M.E. (2012). Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*, 7(9): e43928.
- Noss, C.I., Dennis, W.H., Olivieri, V.P., 1983. Reactivity of Chlorine Dioxide with Nucleic-acids and Proteins. In *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 4 (Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cotruvo, J.A., Cumming, R.B., Mattice, J.S., Jacobs, V.A., Eds.). Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor. Mich, 1077-1086
- Ntrouka, V., Hoogenkamp, M., Zaura, E., van der Weijden, F. (2011). The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants*, 22(11): 1227-1234.
- Organji, R.S., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Osman, G.E.H., Khider, M. (2015). Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 5(7): 515-520.
- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A. Degraeve, P. (2008). Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with different dairy products. *Food Control*, 19: 178-185
- Pagedar, A., Singh, J. (2012). Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. *Int Dairy J.*, 23(1): 30-35.
- Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S., Brooks, J.D. (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J Appl Microbiol*, 90(6): 901-908.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N., Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*, 54:269-276.
- Ramos-Villaruel, A.Y., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2015). Combined effects of malic acid dip and pulsed light treatments on the inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* on fresh-cut produce. *Food Control*, 52: 112-118.
- Ricke S.C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sciences*, 82: 632-639.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J Food Prot*, 68(12), 2614-2622.
- Sadiq, R., Rodriguez, M.J. (2004). Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: A review. *Sci Total Environ*. 321: 21-46.
- Sánchez, G., Elizaguível, P., Aznar, R., Selma, M.V. (2015). Virucidal effect of high power ultrasound combined with a chemical sanitizer containing peroxyacetic acid for water reconditioning in the fresh-cut industry. *Food Control*, 52: 126-131.
- Schaeffer, A.B., Fulton, M.D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990): 194-194.
- Simões, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci Technol*, 43(4): 573-583.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2): 175-179.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Leijendekkers, S., Rombouts, F.M. (1996). Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology*, 13(1), 53-58.
- Van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K., Uyttendaele, M. (2013). Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. *Appl Environ Microbiol*, 79(9): 2850-2861.

Virto, R., Manas, P., Alvarez, I., Condon, S., Raso, J. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Appl Environ Microbiol*, 71(9): 5022-5028.

Waters, B.W., Hung, Y.C. (2014). The effect of organic loads on stability of various chlorine-based sanitisers. *Int J Food Sci Technol*, 49(3): 867-875.

Williams, V., Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol*, 62: 100-104.

Zhang, Q.Q., Ye, K.P., Juneja, V.K., Xu, X. (2017). Response surface model for the reduction of *Salmonella* biofilm on stainless steel with lactic acid, ethanol, and chlorine as controlling factors. *J. Food Saf.*, 37(3).1-7.