

Bakteriyel Biyofilmlerdeki Antimikrobiyel Direnç Mekanizması

Emel Ünal Turhan¹, Zerrin Erginkaya²¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadiri Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Kadiri, Osmaniye²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balcalı, Adana

Geliş Tarihi (Received): 21.03.2018, Kabul Tarihi (Accepted): 06.06.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): emelunalturhan@gmail.com (E. Ünal Turhan)

☎ 0 328 888 00 90 📠 0 328 888 00 91

ÖZ

Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri ekzopolimerik yapıda jelsi bir tabaka içine gömülü halde birbirlerine, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye tutunarak oluşturdukları topluluk olarak tanımlanır. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumu gıdalarda bozulmalara, gıda işleme ekipmanlarında hasarlara ve patojen kontaminasyonları ile hastalıklara neden olduğu için istenmeyen bir durumdur. Biyofilmler antimikrobiyel maddelere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidirler. Biyofilmlerdeki bakterilerin antimikrobiyellere karşı gösterdikleri dirençten birçok olası mekanizma sorumludur. Biyofilmlerdeki direnç mekanizmasını etkileyen başlıca faktörler ekzopolisakkarit matriksi, enzimler, heterojenlik, hücresel persistans, metabolik aktivite, genetik adaptasyon, kitle algılama, stres cevapları, dış membran yapısı ve sızdırma pompaları'dır. Direnç mekanizmalarının tam olarak anlaşılması biyofilm oluşumunun önlenmesi ve kontrol edilmesinde fayda sağlayacaktır. Sonuç olarak etkili bir biyofilm kontrolü için araştırmacılar öncelikle direnç mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmalı ve daha sonra koruyucu önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu derlemede, gıda endüstrisindeki bakteriyel biyofilmlerin antimikrobiyel maddelere karşı gösterdikleri direnç mekanizması üzerinde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Antimikrobiyel direnç, Gıda endüstrisi

Mechanism of Antimicrobial Resistance in Bacterial Biofilms

ABSTRACT

Biofilm is defined as a community in which microorganisms adhere to a living or inanimate surface, embedded in a gelatinous layer in a self-produced matrix of extrapolymeric substances, adhered to each other, to a solid surface or to an interface. In food industry, biofilm formation is undesirable as they cause food spoilage, damages in food processing equipment and diseases due to pathogenic contamination. Biofilms are more resistant to antimicrobial agents than planktonic cells. There are various possible mechanisms responsible for antimicrobial resistance of the bacteria in biofilms. The main factors that affect resistance mechanism in biofilms are characterized as exopolysaccharide matrix, enzymes, heterogeneity, cellular persistence, metabolic activity, genetic adaptation, quorum sensing, stress responses, outer membrane structure and efflux pumps. A whole understanding of resistance mechanisms can provide benefits to prevent and control biofilm formation. As a result, researchers should initially focus on the mechanisms of resistance for effective biofilm control and then protective measures must be taken. In the present review, the resistance mechanisms of bacterial biofilms in food industry against antimicrobial agents are focused.

Keywords: Biofilm, Antimicrobial resistance, Food industry

GİRİŞ

Mikrobiyologların çoğunluğu çalışmalarını mikroorganizmaların planktonik hücreleri üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Ancak son zamanlarda biyofilmlerdeki tutunan bakteri formları üzerinde de durulmaya başlanmış ve ilgi çekici sonuçlar elde edilmiştir. Biyofilm konusu günümüzde mikrobiyolojideki en popüler konulardan biridir. Biyofilmler bakterileri koruyucu bir tabaka gibi sarar ve onlara direnç kazandırır [1-3]. Şimdiye kadar ağırlıklı olarak biyofilm kontrolü ile ilgili çalışmalar üzerinde durulmuş ancak biyofilm direnç mekanizması üzerinde pek durulmamıştır. Yeni antibiyofilm stratejileri geliştirilirken direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmesi elzemdir [1].

Biyofilmler ile ilgili daha önceki araştırmalarda çoğunlukla, su dağıtım sistemleri, atık su arıtma ve dış plakları üzerinde durulmakta ve bu konularla sınırlı tutulmaktaydı. Ancak gıda güvenliğini doğrudan ilgilendiren bir konu olması bakımından gıda endüstrisinin de ilgisini çekmektedir [4]. Gıda işleme ekipmanlarında ve gıda ile temas eden yüzeylerde oluşan biyofilmler gıda ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini ve güvenliğini tehdit eden kontaminasyon kaynağı olarak rol oynamakla birlikte gıda kaynaklı hastalıklara ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu nedenle, biyofilm kontrolü ve önlenmesi gıda endüstrinin önceliği olmuştur [5-7]. Gıda endüstrisinde sıklıkla *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. ve *Vibrio* spp. tarafından oluşturulan biyofilmler izole edilmiştir [8-10].

Biyofilmlerdeki bakteriler yüksek konsantrasyonda ve birbirlerine yakın temasta bulunurlar. Biyofilm matrisi hücre etkileşimlerini kolaylaştıran besin ve bileşikler konsantrasyonunu abiyotik ve biyotik muamelelerden bakteriyi korur. Biyofilmler genetik elementlerin transferini, bakteriyel dayanım ve kalıcılığı geliştiren ideal koruyucu yapılar sağlayabilir, nitekim bu elementlerde biyofilm oluşumunu destekleyebilir. Sonuçta, biyofilmler bakterileri antimikrobiyellere karşı korudukları için antimikrobiyel direncin ortaya çıkmasında ve yayılmasında rol oynayabilirler [11].

Biyofilm kontrolü ve önlenmesinde geleneksel antimikrobiyel protokoller çoğunlukla başarılı olamamaktadır. Bakterilerin geçen zamanla birlikte evrim göstermesi ve stres faktörlerinde hayatta kalmak için bir takım mekanizmalar geliştirmesi biyofilm kontrolünü zorlaştırmıştır [12]. Biyofilmlerin antimikrobiyel ajanlara karşı daha dirençli olmalarını sağlayan belli başlı özellikleri; ekzopolisakkarit (EPS), ekzopolimerlerle etkileşimler, popülasyondaki fizyolojik heterojenlik, direnç geni transferi ile dirençli fenotiplerin gelişimi, antimikrobiyellerin çapraz direnci, biyofilmlerin persister hücreleri, tutunan hücrelerin yavaş gelişme hızı vb. şeklinde sıralanabilir [13-15].

Bakteriyel biyofilmlerin antimikrobiyel muamelesine karşı gösterdikleri artan direnç, biyofilm kontrolünde yeni yöntemlerin uygulanmasını gerektirir. Bu sebepten ötürü

her bir biyofilm sorunu ele alınırken oluşumları ve direnç mekanizmaları göz önünde bulundurulmalıdır [16]. Bu derlemede, gıda endüstrisindeki biyofilm oluşumu ve biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizmaları araştırılmıştır.

GIDA ENDÜSTRİSİNDEKİ BİYOFİMLER

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka (EPS) içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir [17-19].

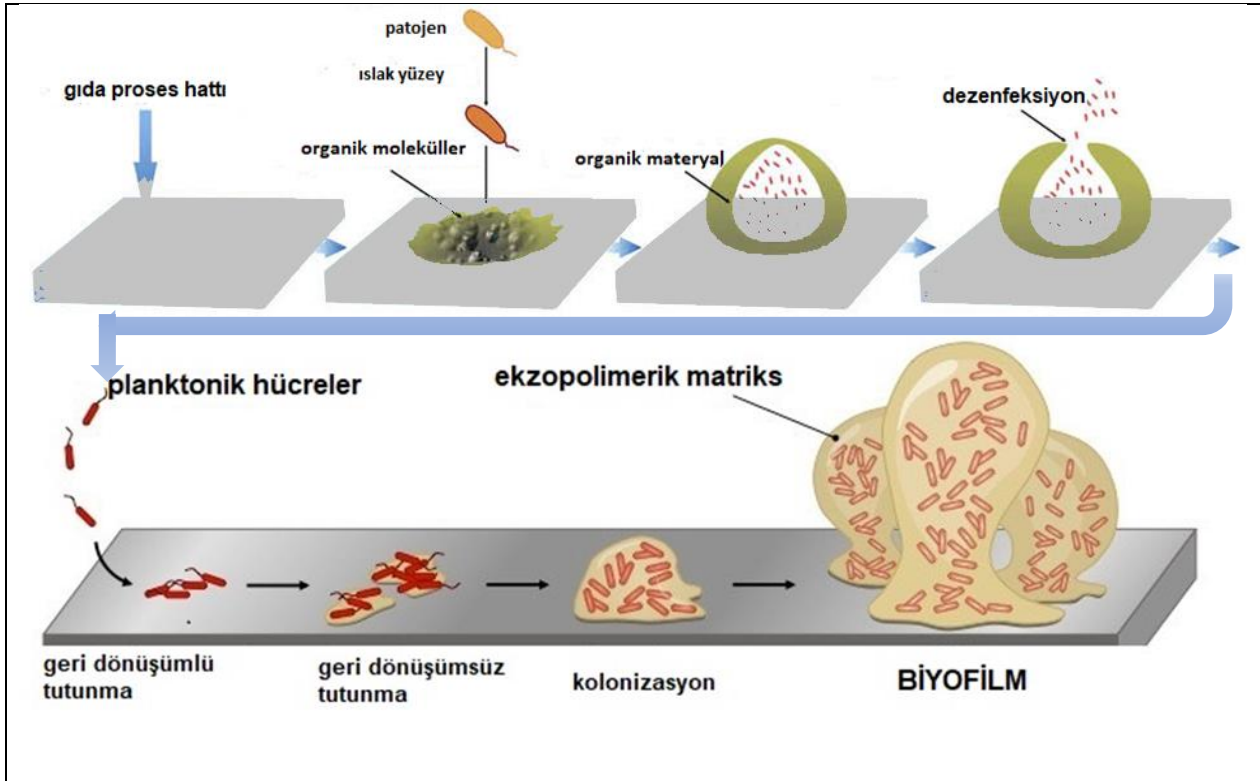
Gıda endüstrisindeki biyofilm oluşumu Şekil 1'de özetlenmiştir. Gıda endüstrisindeki biyofilm oluşumu genellikle gıda işleme hatlarında kullanılan alet ekipmanının yüzeyinde biriken organik moleküllerin bakterileri cezbetmesiyle başlar. Organik moleküllerden dolayı alet ekipmana bulaşan bakterilerin dayanıklı hücreleri (persisterler) temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri gibi stres faktörlerine direnç göstererek hayatta kalırlar (stres cevabı) ve alet ekipmanının yüzeyine geri dönüşümlü olarak tutunurlar. Geri dönüşümlü tutunmada bakteri yüzeyin yakınındadır, ancak henüz yüzeye tam olarak temas etmemiştir. Bakterinin yapmış olduğu zayıf bağların kalıcıya dönüşmesi ile ise dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Dönüşümsüz tutunmada bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere tutunur. Geri dönüşümsüz tutunan hücreler, hücre-hücre adezyonu ve hücre gen ekspresyonu ile yüzeyde koloniler oluşturup çoğalırlar. Oluşan mikrokoloniler ise kitle (quorum) algılama sistemleri ile bakteriyel biyofilmleri oluştururlar [8, 20-23].

Biyofilm oluşumu canlı hücrelerde veya cansız yüzeylerde meydana gelebilir [14, 20]. Biyofilm oluşumu; diğer bakterilerin varlığı, besin miktarı, sıcaklık, oksijen miktarı ve pH gibi faktörlerden etkilenir [6]. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabileceği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerden oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikro kolonisini oluşturur ve bu mikro koloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. Su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar [21, 22]. Biyofilm bileşiminin %98'i sudan oluşmaktadır ve bileşiminde bulunan diğer maddeler ekstrasellüler matris yapı ile birbirlerine tutunmaktadır. EPS'ler biyofilmlerin morfolojik, yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinden sorumludur. EPS'nin bileşimi polisakkarit, protein, nükleik asit, teikoik asit, fosfolipit ve diğer polimerik maddelerden oluşmakta ve biyofilmlerin %75-90'ını oluşturmaktadır [8, 20, 23]. Biyofilm yapısında bulunan su, bakterinin oluşturduğu EPS'ye bağlanmaktadır [24]. EPS'ler biyofilm oluşturarak mikroorganizmaların koloni oluşmasına ve yüzeye bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Hücrelerin çoklu katmanları ve EPS antimikrobiyellerin nüfuz etmesini ve iç katmanlara ulaşmasını zorlaştıran kompleks bir yapı oluşturabilirler [15, 25]. Böylece organizmayı osmotik strese, faj bulaşmasına, toksik bileşiklere, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı koruyabilmektedirler [22]. Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar antimikrobiyel bileşenlere karşı

planktonik formlarından 10-1000 kat daha dirençlidirler [12, 14, 15, 17].

Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumu genellikle yetersiz veya eksik temizleme işlemlerinden kaynaklanmaktadır. Organik moleküller her türlü yüzeyde birikebilir ve üretimde kullanılan su mikrobiyel gelişim için iyi bir ortam sağlayabilir. Ayrıca substratın fiziksel karakteristikleri de biyofilm oluşumundaki ilk aşama olan tutunmayı etkilemektedir [22, 26]. Endüstriyel tesislerin proses hatlarında kir birikme ihtimalinin olduğu contalar, çıkmaz uçlar, eklemeler, valfler, köşeler, kırıklar veya çatlaklar gibi biyofilm oluşumunu tetikleyecek kritik noktalar mevcuttur. Biyofilm oluşumu endüstriyel düzeyde kullanılan alet ekipmanın zarar görmesine veya etkinliğinin azalmasına yol açarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır [7, 21]. Ayrıca halk sağlığını tehdit eden patojen ve gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmaların birikimine neden olması ile de

istenmeyen bir durumdur. Biyofilmler genellikle, geliştiği ortam koşullarına, yani sıcaklık, pH ve mevcut besin türüne göre değişen çeşitli bakteri türleri tarafından oluşturulabilmektedir [27]. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumuna neden olan mikroorganizma türleri üretim alanına göre değişmektedir. Süt endüstrisinde; *Enterobacter* spp., *Listeria* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., balık işleme endüstrisinde; *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Aeromonas*, *Pseudomonas* spp., kümes hayvanları endüstrisinde; *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., et ensütisinde *E. coli* O157:H7, *Acinetobacter calcoaceticus* ve son olarak hazır gıda endüstrisinde; *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 mikroorganizmalarının neden olduğu biyofilm oluşumlarına rastlanılmıştır [28].



Şekil 1. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşum aşamaları [22, 23 ve 28'den modifiye edilerek uyarlanmıştır]

BİYOFİLM KONTROLÜ

Mikrobiyel kontrolün amacı, mikroorganizmaların ve bunların aktivitelerinin kabul edilebilir bir düzeye getirilmesinin yanı sıra proses ekipmanı üzerinde biyolojik birikim oluşumunun önlenmesi ve kontrol edilmesidir [26, 27]. Gıda endüstrisinde hijyen sağlamaya yönelik odaklanma antimikrobiyellerin aşırı kullanımıyla sonuçlanmış ve bu durum antimikrobiyel direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Dezenfeksiyonda uygulanan yanlış işlem parametreleri (dezenfektan konsantrasyonu, sıcaklık ve muamele süresi) bakterilerin inhibisyonunu zorlaştırmış ve bu bakterilerin direnç kazanmasına neden olmuştur. Antimikrobiyel direncin ortaya çıkışı gıda endüstrisi için

ekonomik sorun olarak değerlendirilir ve gerek halk sağlığı açısından gerekse üretici açısından istenmeyen bir durumdur. Etkili bir dezenfeksiyon ve temizleme sistemi ile antimikrobiyel direnç sorununun üstesinden gelinbilir [26]. Biyofilm oluşumunun engellenmesinde birincil ve en önemli nokta hücrelerin yüzeye tutunmalarını engellemek için düzenli ve etkin temizlik/dezenfeksiyon işlemlerinin yapılmasıdır [22]. Biyofilm kontrolünde çoğunlukla kimyasal bazı antimikrobiyel madde kullanımına başvurulmakla birlikte son yıllarda enzim, bakteriyosin, faj, ultrasonikasyon vb. uygulamaları gibi yeni kontrol yöntemleri üzerinde de durulmaya başlanmıştır [28-30]. Biyofilmleri yok etmek veya ortadan kaldırmak için kullanılan antimikrobiyel kimyasal maddeler EPS'e nüfuz etmelidir ve mikrobiyel

hücreye geçişi sağlanmalıdır [22, 25]. Biyofilmlerin yok edilmesinde bakterisidal aktivitenin biyofilmi çevreleyen ortamdan da etkilendiği bilindiği için doğru bir temizlik planı yapılması gerekir. Antimikrobiyel maddelerin aktivitesi üzerinde pH, su sertliği, ortamda diğer katkı maddelerinin bulunması ve sıcaklık gibi çevresel faktörler ile antimikrobiyel konsantrasyonu, maruz kalma süresi, organik bileşiklerin varlığı, mikroorganizmaların türü ve gelişme hızı gibi diğer faktörler etkili olmaktadır [27]. Logaritmik fazdaki hücreler antimikrobiyel maddelere durgun fazdaki hücrelere göre daha duyarlıdır [17]. Biyofilm hücreleri biyofilmlerin hücrelere difüzyonunu engelleyen fizyolojik heterojenliklerinin ve EPS varlığının bir sonucu olarak stres faktörlerine karşı daha dirençlidirler [25].

Biyofilm gelişimi mikroorganizmaya bir takım avantajlar sağlamıştır. Bu avantajlar; (i) antimikrobiyel ajanlardan koruma, (ii) mikroorganizma gelişimi için gerekli olan besinleri sağlama, (iii) su moleküllerinin daha çok bağlanmasını sağlama ve böylece kuruma ihtimalinin düşmesi ve (iv) plazmit transferini kolaylaştırması olarak sıralanabilir. Biyofilmin mikroorganizmaya sağladığı tüm bu avantajlar ise mikrobiyel inaktivasyonu zorlaştırmıştır [4].

ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMASI

Antimikrobiyel direnç mikrobiyel gelişimi durdurmaya veya yok etmeye yönelik olarak uygulanan antimikrobiyel bir maddeye karşı bir mikroorganizmanın gösterdiği dirençtir. Mikroorganizmalar çok çeşitli mekanizmalarla direnç gösterebilmektedirler [21]. Antimikrobiyel etki mekanizmasında mikroorganizmada minimum inhibitör konsantrasyonu ve bunun sonucunda oluşan biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler dikkate alınmaktadır. Antimikrobiyel etki, aktif madde ile mikrobiyel hücredeki spesifik hedefler (hücre duvarı, sitoplazmik membran, membran enzimleri, sitoplazma ve genetik materyal) arasındaki etkileşim olarak tanımlanabilir. Hücre duvarından kaynaklanan ek bir korumaya sahip olan gram negatif bakteriler gram pozitif bakterilere göre antimikrobiyel maddelere karşı daha dirençlidirler [27]. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki potansiyel hedef bölgeleri; hücre duvarı, dış membran, stoplazmik membran, fonksiyonel ve yapısal proteinler, DNA, RNA ve diğer sitozolik bileşiklerdir [24].

Bakteriler zararlı bir stres ortamına maruz kaldıklarında canlılıklarını sürdürmek için tüm imkânlarını kullanacaklardır. Çevresel koşullar gibi dış stres faktörlerinin farklı mikroorganizmalar üzerinde farklı inhibisyon ve/veya inaktivasyon etkileri vardır. Normal çevre koşullarındaki herhangi bir eksiklik mikrobiyel gelişme hızının düşmesine neden olur. Biyofilmler antimikrobiyellerin sub-letal dozlarına maruz kaldıklarında sadece minör hücre hasarları görülür. Bakteriyel hücrelerin fenotiplerindeki bu değişiklikler ve gen ekspresyonunun tetiklenmesi daha dirençli türlerin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır [26]. Direnç mekanizmaları, canlı mikroorganizmaların hayatta kalmak için sürekli değişen çevreye cevap vermek zorunda oldukları araçlardır. Direnç bir

mikroorganizmanın belirli koşullar altında belli bir kimyasal muameleye nisbi duyarsızlığı, canlılığı veya çoğalması olarak da tanımlanabilir. Direnç çeşitleri içsel veya doğal (fenotipik), kazanılmış (genotipik) ve mutasyon olmak üzere üçe ayrılır. Doğal veya içsel direnç, mikroorganizmanın kalıtsal özelliklerinden kaynaklanan cins veya türe özgü antimikrobiyel maddelere dayanabilme yeteneğidir. Genellikle plazmitlerin aracılık ettiği kazanılmış dirençte ise bakteriler yatay gen transferi ile antibiyotik direnci kazanabilirler. Bu direnç mekanizması ile bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türe ait başka bir bakteriye hatta farklı türdeki bakterilere dahi taşınabilir. Son olarak mutasyonlar ise direnç gelişiminde pek fazla rol oynamamakla birlikte genomda bulunan birçok bölgede genetik değişikliklere neden olabilirler [24, 27].

Bağlı hücreler planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında antimikrobiyellere karşı daha dirençli bir fenotipe sahiptirler [5, 27]. Yani biyofilm hücreleri antimikrobiyel ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyel ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler [10, 22, 31]. Planktonik hücrelerin dezenfektanlara duyarlılığını belirlemede yayınlanan iyi bilinen standartların (EN 1040,NF T 150) aksine biyofilm hücrelerinin dezenfektanlara duyarlılığını değerlendirmede standart bir yöntemle rastlanamamıştır. Ancak planktonik hücreler için hazırlanan standartlar biyofilmlere uyarlanabilir [14, 32]. Biyofilm hücrelerindeki direnç; planktonik veya biyofilm popülasyonunda aynı düzeyde indirgemeyi (inhibisyonu) sağlamak için gereken antimikrobiyel madde konsantrasyon oranı (D_k) (Eşitlik 1) veya süre oranı (D_s) (Eşitlik 2)ölçülerek değerlendirilebilir, ya da aynı zaman periyodunda aynı konsantrasyona maruz bırakıldıktan sonraki elde edilen indirgeme (inhibisyon) karşılaştırılarak değerlendirilebilir. Literatürlerden edinilen bilgiye göre mikroorganizma türüne ve kullanılan antimikrobiyel çeşidine göre bu oran D_k için 1'den 1000'e ve D_s için 20'den 2160'a kadar uzanmaktadır.

D_k = Biyofilm inhibisyonu için gerekli antimikrobiyel madde konsantrasyonu/planktonik hücre inhibisyonu için gerekli antimikrobiyel madde konsantrasyonu (1)
 D_s =Biyofilm inhibisyonu için gerekli süre/ planktonik hücre inhibisyonu için gerekli süre (2)

Biyofilmlerin antibiyotiklere olan direnç mekanizması ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve iyi bilinmektedir ancak gıda koruyucuları, dezenfektanlar ve antiseptiklere direnç ile ilgili çalışma sayısı nispeten azdır ve hala tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır [24, 32]. Biyofilmlerin antimikrobiyellere karşı oluşturdukları yaygın direnç mekanizmaları "ekzopolisakkarit matriksi, enzimler, heterojenlik, hücresel persistans, metabolik aktivite, genetik adaptasyon, kitle algılama, stres cevapları, dış membran yapısı ve sızdırma pompaları" şeklinde sıralanabilir [27].

EPS Matriksi-Glikokaliks

Biyofilm tabakası dezenfektan madde geçirgenliğine engel olarak biyofilm içerisindeki bakterinin direnç kazanmasına yardımcı olmaktadır. Biyofilm yapısındaki

bu jelimsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer” (EPS) adı verilen polisakarit bazlı ağ yapısıdır [24]. Biyofilm tabakasında EPS yerine de kullanılan kapsül veya kılıf gibi terimlerle de ifade edilen glikokaliks de görev almaktadır [16].

Lifli polisakaritler veya globüler glikoproteinler ve sudan oluşan glikokaliks (kapsül) biyofilmlerin ayrılmaz bir parçasıdır ve kimyasal olarak aktif bir bariyer gibi düşünülebilir. Bakterilerin antibiyotiklere ve diğer antimikrobiyel ajanların bileşenlerine karşı direnci glikokaliks matrisi tarafından desteklenir [33, 34, 35]. Glikokaliks antimikrobiyel ajanları adsorbe ederek mikrobiyel direnci artırır. Glikokaliks tabakası ağırlığının %25'ine kadar antibakteriyel molekülü adsorbe edebilir. Matrisin adsorpsiyon alanı biyositlerin ulaşımını sınırlandırır ve ekzoenzimleri tutar. Ekzoenzimler biyositleri indirgeyerek antimikrobiyel aktivitelerini yavaşlatır [36].

Mikroorganizmaların inaktive edilebilmeleri için yeterli konsantrasyonda antimikrobiyel madde ile muamele edilmeleri gerekmektedir. Ancak biyofilmlerdeki EPS matrisi antimikrobiyel maddelerin hedef bölgeye istenen konsantrasyonda ulaşmasına engel olmakta ve bir bariyer görevi görerek mikroorganizmaya direnç kazandırmaktadır [14]. Anyonik EPS matrisi toksik katyonik ağır metalleri, katyonik antimikrobiyel peptitleri ve pozitif yüklü antibiyotikleri (aminoglikozitler) bağlayabilir. Ancak beta-laktam gibi nispeten yüksüz antibiyotiklerde böylesi bir bağlanma söz konusu değildir. Genelde, antibiyotikler EPS matrisine ya çok az nüfuz ederler ya da hiç giremezler. Bundan dolayı antibiyotiklerin EPS matrisindeki düşük penetrasyonu antibiyotik direncinde EPS matrisinin çok da etkili olmadığını düşündürmüştür [1].

Enzim Kaynaklı Direnç

Bakteriler, bazı antimikrobiyel maddeleri yıkacak ya da inaktive edecek enzim salgılayabilirler. Daha az reaktif veya yüksüz antimikrobiyel moleküllerin enzimler ile inaktivasyonu biyofilmlerin direnç kazanmasına yol açar. Enzim kaynaklı difüzyon kısıtlaması ile, glikokalikste enzimler konsantre hale gelmekte ve duyarlı antimikrobiyeller nötralize edilmektedir [13]. Biyofilmlerdeki enzim varlığı ile aynı zamanda aromatik fenolik ve diğer ağır metaller gibi toksik bileşikler indirgenerek detoksifikasyon gerçekleştirilir ve biyofilmlerin toksik bileşenlere karşı dayanımı sağlanır [14]. Özetle antimikrobiyel bileşikleri indirgeyen enzimlerin üretimi biyofilmlere enzim kaynaklı direnç özelliği sağlar [16]. Gram negatif bakterilerde bulunan beta laktamaz enzimi beta laktam antibiyotiğini hidrolize ederek bu antibiyotiğe olan duyarlılığı ortadan kaldırır. Bir diğer antibiyotik grubu olan aminoglikozitler; asetiltransferaz, nükleotidiltransferaz ve fosfotransferazlar ile enzimatik degradasyona maruz bırakılarak mikroorganizmanın bu gruptaki antibiyotiklere karşı dirençli olmasını sağlamıştır. Enzimatik degradasyon ile antibiyotikler bağlanma kapasitelerini kaybederler ve böylece antimikrobiyel aktivite sergileyemezler [21].

Fizyolojik Heterojenlik

Bakterilerin biyofilmlerdeki yoğunlukları biyofilm tabakasındaki besin maddeleri ve oksijen konsantrasyonuna göre değişmektedir. Biyofilmin en dış kısımlarında yerleşen bakteriler besin maddelerine ve oksijene derinlerdeki bakterilere göre daha rahat ulaşabilmekte ve bu durum bakteri popülasyonu içinde bir heterojenliğe yol açmaktadır [26, 27].

Mikrobiyel popülasyondaki genotipik ve fenotipik heterojenliğin kaynağı biyofilmlerin üç boyutlu yapısından ileri gelmektedir. Heterojenlik; antimikrobiyel stres gibi istenmeyen koşullara maruz kalma durumunda mikrobiyel popülasyonların adaptasyon yeteneğini artırarak hücrelerin dayanıklılık kazanmasını sağlar [10, 14]. Biyofilm tabakasına nüfuz eden oksijen ve besin miktarı kimyasal heterojenliğe neden olarak bakterinin gelişme hızı ve metabolizmasını etkilemektedir. Besinlerin iç tabakaya zayıf difüzyonu bakterideki metabolik potansiyelin sınırlanmasına ve biyofilm matrisinin içinde gelişimin azalmasına sebep olur [37]. Biyofilm tabakasına nüfus eden bileşenlerden kaynaklanan kimyasal heterojenliğin bir sonucu olarak biyofilmlerde fizyolojik heterojenlik ortaya çıkar. Fizyolojik heterojenlik biyofilmlerin iç tabakasında görülen oksijen ve besin eksikliği durumunda özel bir koruyucu faktörün ortaya çıkmasına ve biyofilmlerin direnç kazanmasına neden olur [1, 33]. Biyositler metabolik olarak aktif bakterileri inhibe eder, ancak durağan gelişme fazındaki bakteri antimikrobiyel ajanlara daha az duyarlıdır ve bu durum onları antimikrobiyel etkiden korur. Sonuçta, antimikrobiyel ajanlara karşı bakteriyel biyofilmlerdeki artan direnç metabolik gelişme hızı heterojenliği fikrini güçlendirmiştir [32].

Hücresel Persistans (Dayanım)

Persisterler antimikrobiyel ajanlara toleranslı popülasyonlardır ve şiddetli kronik hastalıklardan sorumludurlar. Persisterler stres koşullarında hayatta kalmak için fenotipik olarak değişim gösterirler ve dormant (durağan) forma geçerler [12]. Persister hücrelere durgun fazdaki planktonik kültürlerin bazılarında ve biyofilmlerde rastlanılmaktadır. Durgun fazdaki bakteri stres koşullarında persister hücreleri ile kendilerini korumaya alırlar. Biyofilmlerde aynı durgun fazdaki hücre gibi kendisini korumaya almak için persister üretir. Biyofilmlerdeki persister hücreler fenotipik değişiklikler gösterip dezenfektanların hedef bölgelerini bloke edebilir ve dezenfektanlara karşı direnci ortaya çıkarabilir [14].

Bakterilerin gelişme fazlarıyla kontrol edilen persister hücrelerin oluşumu hızla yayılır ve persisterler ölümcül dozlardaki antimikrobiyel ajanların varlığında bile hayatta kalır. Durgun fazdaki bakteri yüksek düzeylerde persister hücre üretmiştir ve bu durum biyofilmlerdeki artan dirençle ilişkilendirilmiştir [1, 17]. Glikokaliks matrisi immün sistemi korumak için biyofilm persisterlerine yardım eder. Tutunan bakteriyel popülasyonda antibiyotiklerin sonlandırılmasının ardından, persister hücreler bakteriyel biyofilmlerin

gelişimini tekrardan tetiklemeğe başlarlar. Persisterler çoklu ilaç direnci proteinlerinin üretimi için antibiyotiklerle rekabet eder. Antibiyotikler inhibisyondan ziyade hedef hücrelerin fonksiyonlarını bozarak bakterisidal etki gösterirler. Persisterlerin tolerans olayı aynı zamanda programlı hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir buna karşın antimikrobiyel bileşiklerin etkisi hücrelerde zarara yol açar ancak tam bir hücre ölümü gerçekleşmez programlı hücre ölümünü dolaylı olarak tetikler [32, 38].

Metabolik Aktivite - Durgun Faz Fizyolojisi

Bakteriler antimikrobiyal maddelerin hedef aldığı metabolik yolları iç değişikliklerle modifiye ederek stres koşullarında kendilerini korumaya alırlar. Bakterinin yaptığı bu fenotipik değişiklikler antimikrobiyal maddenin hedef bölgeye ulaşmasını engelleyerek bakteriyeye direnç kazandırmış olur [39-43].

Biyofilmler bilindiği üzere çok katmanlı yapılardan oluşmaktadır ve biyofilmlerin merkezine doğru gidildikçe oksijen miktarı, gelişme hızı, protein sentezi ve metabolik aktivite değişiklik göstermektedir. Biyofilmin yüzeyinde mikrobiyel aktivite yüksek seviyede iken derinlere yani merkeze doğru ilerledikçe mikrobiyel aktivite düşmekte veya tamamen durmaktadır yani durgun faz durumuna geçmektedir. Biyofilmlerde antimikrobiyel maddelere karşı duyarlılığın azalmasındaki sebeplerden biri de budur [39].

Biyofilm direnci biyofilme biyofilm spesifik gelişmenin zorlanması ile açıklanmıştır. Mikrobiyel hücrelerin fizyolojik durumuna yani gelişme fazlarına ve buldukları ortamın özelliklerine göre bakterisitlere karşı gösterdikleri duyarlılık değişebilmektedir. Besinlerin sınırlı düzeyde bulunması bariyer bileşimini etkiler ve bakteriyel hücre zarfını (hücre zarı ve hücre duvarı) değiştirir. Biyofilmler bakterisitlerin öldürücü dozlarına maruz kaldıktan sonra, dirençli hücre popülasyonu fenotipik adaptasyon gösterir [1]. Örneğin, *E. coli*'deki sıcaklık ve besin eksikliği stresleri UV ışınlarına veya H₂O₂'ye karşı direnci tetikler. Enterokokal hücrelerde oksidatif stresten sonra antioksidatif enzimler artan, prooksidatif enzimler ise azalan yönde eğilim gösterir. Ancak enterokokların fenotipik olarak dirençli oldukları bakterisitlerin ortadan kalkmasıyla birlikte enzimlerde görülen bu eğilim kaybolmaya başlar. Özetle biyofilmdaki besin eksikliğinin yavaş gelişmeye ve açlık durumuna neden olduğu ve direnç mekanizmasını tetiklediği ileri sürülmüştür [28, 32].

Genetik Adaptasyon

Bakteriler genetik adaptasyon ile antimikrobiyal maddelere karşı direnç kazanabilirler. Bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türe ait başka bir bakteriyeye hatta farklı türdeki bakterilere dahi taşınabilir. Bakterilerdeki genetik adaptasyon mekanizması, genlerde birbirini takip eden mutasyon ve rekombinasyonlar ile yeni genetik materyal kazanarak veya mevcut olan genetik materyalin sunumu ile işlemektedir. Bakterilerin ortama genetik adaptasyon göstererek, büyüme ve çoğalmasını devam ettirebilmek

için oluşturdukları biyofilmler, bakterinin adaptasyonu ile ilgili en önemli örnektir [28, 31, 34, 43].

Genetik adaptasyon; biyofilmlerdeki duyarlılığı azaltmak ve farklı fenotiplere uyum sağlamak için istenir. Stres koşulları altında yavaş gelişen veya durağan (dormant) mikrobiyel popülasyonlar genetik adaptasyon ile dirençli hale gelirler [1, 12]. Biyofilmlerdeki genetik transfer oranı planktonik hücre türlerine göre daha yüksektir [20]. Özellikle oksidatif strese maruz kalan mikrobiyel hücreler genetik adaptasyon ile çoklu ilaç direnci göstermektedirler [39]. Çoklu antibiyotik direnci operonları, *E. coli*'de çeşitli genlerin ortaya çıkışını kontrol eden ve çoklu ilaç direnci (antibiyotikler, organik çözücüler ve diğer dezenfektanlar) fenotipini destekleyen geniş çaplı düzenleyicilerdir. *E. coli*'de "kodlayıcı katalizörler; süperoksit dismutazları, hidroperoksit redüktazları ve alkil glutatyon redüktazları yanı sıra DNA onarım enzimleri" gibi çeşitli savunma genleri mevcuttur. Bakterilerin çoğu fermentatif olmakla birlikte yükseltgen maddelere maruz kaldıklarında enzimleri indirgeyip tamir eden oksidantlar üreterek stres cevabı verirler. Burada "oxyR ve soxR" gibi çeşitli düzenleyici genler bahsedilen stres cevabını aktif hale getirir ve intraselüler redoks potansiyelini belirlerler [32]. Başka bir çalışmada ise *Streptococcus mutans*'ın farklı yüzey koşullarında biyofilm oluşumlarının genetik adaptasyon ile mümkün olduğu bildirilmiştir [44].

Kitle (quorum) Algılama

Bakteriler sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar ve belli bir yoğunluğa (yeterli çoğunluk) ulaştıklarında toplu davranış şekli sergileyip her zamankinden farklı fenotipik özellikler gösterirler. Bakterilerin yeterli sayıda çoğunluğa ulaştıklarında göstermiş oldukları bu fenotipik değişiklikler onları olumsuz koşullara karşı daha dirençli hale getiren "kitle algılama" mekanizması ile açıklanmaktadır. Bu mekanizma sayesinde bakterilerde iş birliğinin devamı, enzimatik aktivitelerin düzenlenmesi, virülans özelliklerin ortaya çıkarılması ve planktonik formda iken sahip olmadıkları yeni özelliklerin kazanılması mümkün olmaktadır [43].

Bakterilerin kitle algılama ile kurmuş oldukları interaksyonlar biyofilm yapısının şekillenmesinde rol oynamaktadır. Biyofilmlerdeki bakterilerin haberleşmesini sağlayan hücre-hücre interaksyon prosesi kitle (quorum) algılama ile bakterinin fonksiyonunu düzenler [16, 23].

Bakterilerdeki iletişim mekanizması çoğunlukla düşük moleküler ağırlıklı sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır. Bakterilerin hücre yoğunluğu düşük olduğunda sinyallerin hücre dışı konsantrasyonu da düşük olacak ve ortaya çıkamayacaktır. Ancak biyofilm popülasyonundaki hücre yoğunluğu arttıkça, bakterinin algılayıp cevap verebileceği sinyal moleküllerine olanak sağlayan kritik sinyal konsantrasyonuna ulaşılacaktır [6, 7]. Biyofilm oluşumunun ilk aşamasındaki tutunma safhasına dahil olan Pili (fibril-fimbriae) ve flagella gibi hücre dışı uzantılar aynı zamanda hücre-yüzey ve hücre-hücre interaksyonunda rol oynamakta ve bu durum sinyal molekülleri ile düzenlenmektedir [40].

Kitle algılama olarak adlandırılan sistemde, bir bakteri başka bir bakteri ile oto uyarıcıları ve sinyal moleküllerini kullanarak iletişim kurmaktadır [20, 39]. Bakterilerde tür içi ve türler arası olmak üzere iki çeşit kitle algılama sistemi bulunmaktadır. Türler arası iletişimde değişik otouyarıcılar tanımlanmıştır. Gram negatif bakterilerde genellikle N-açıl-homoserin-laktonlar sinyal molekülü olarak kullanılırken, gram pozitif bakteriler sinyal molekülü olarak küçük peptitlerden yararlanmaktadır [12, 33, 40]. Tür içi iletişimde ise hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler oto uyarıcı-2, furanosil borat diester'i kullanır [1, 40].

Biyofilm oluşumunda sinyal molekülü aracılı kitle algılama birçok bakteri türü tarafından gösterilmiştir. Özel birtakım genlerin induksiyonu ile bakteri artan hücre popülasyonu yoğunluğuna cevap verebilir [10]. Kitle algılama sistemleri biyofilmlerin heterojen yapısını etkilemektedirler. Biyofilmlerdeki bakteri yoğunluğunun az olması sinyal moleküllerinin de az olmasına neden olacaktır. Kitle algılamanın eksikliği daha zayıf biyofilm oluşumuna ve daha az EPS üretimine neden olur ve böylesi bir mutant veya yetersiz oluşan biyofilm kanamisin antibiyotiğine duyarlılık gösterir. [32]. Çoklu tür biyofilmler tekli tür biyofilmlere göre antimikrobiyel ajanlara karşı daha dirençlidirler [41]. Sinyal moleküllerinin eksikliği bakterilerin virülans faktör üretmemesine non-virülant özellik göstermesine yol açar [39].

Stres Cevapları

Biyofilm oluşmasıyla birlikte ortaya çıkan direncin gelişmesinde rol alan bir diğer mekanizma ise stres cevaplarının etkinleşmesidir [21, 22, 27]. Bakteriyel hücreler kuruma, antimikrobiyel ajanlar, yüksek ve düşük sıcaklık gibi çeşitli çevresel streslerden kendilerini korumak için bir takım fizyolojik değişiklikler göstererek stres cevabı gösterirler. Böylece bu hücreler sıcaklık şokunun, soğuk şokunun, pH'daki değişimlerin ve kimyasal ajanların zararlı etkilerinden korunurlar [4, 37].

Biyofilmdeki stres cevabı hücrel stres direncini arttıran bakteriyel fizyoloji ve morfolojideki çeşitli değişikliklerle karakterize edilir. Stres cevabı tamirden ziyade hücrel zarar için önleyici bir faktör gibi çalışır. Durgun faz bakteri gelişimine neden olan besin eksikliği, düşük veya yüksek sıcaklık, daha yüksek ozmolalite ve daha yüksek asitlik gibi çeşitli faktörler stres geni induksiyonundan sorumlu tutulmuştur [1, 12, 15]. Bakterilerdeki genel stres cevabı genlerinin düzenleyicileri SigB ve RpoS gibi sigma faktörleridir ve bu faktörler biyofilmlerin dezenfektanlara karşı direnç kazanmasını sağlarlar [4, 15]. Stres cevabı ile birlikte metabolik aktivitenin düşmesi bakterinin durgun faza geçmesine ve antimikrobiyel ajanlara karşı toleransın artmasına neden olmuştur [14, 32].

Dış Membran Yapısı

Bakterilerde, antimikrobiyel maddelerin inaktivasyon etkilerini gösterebilmeleri için hedef bölgeye bağlanmaları gerekmektedir. Bakterilerin hücre duvarı veya zarındaki yani hedef bölgedeki değişim

bakterilerde direnç gelişimini tetikler [43, 45]. Antimikrobiyel ajanlar hedef bölgeye ulaşmak için içeri girmeye zorlandıkça, bakteriyel hücre direncinden sorumlu olan hücre zarının (hücre zarı ve hücre duvarı) modifikasyonu veya adaptasyonu ile karşılaşırlar. Hidrofilik antimikrobiyel ajanların dış membrana girişleri çoğunlukla lipopolisakkarit tabakası ve uzanan fosfolipitler tarafından önlenirken hidrofobik ajanların içeri girişleri ise dış membran proteinleri tarafından engellenmektedir [32].

Sızdırma (Efflux) Pompaları

Dezenfektan direnci daha çok hücre duvarı ve hücre zarındaki geçirgenlikten ve artan "efflux"tan kaynaklanmaktadır. Bakterilerdeki "sızdırma" sisteminden sorumlu genler genellikle plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Sızdırma sistemleri geniş spektrumlu olup, yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz olan birçok dezenfektan maddeyi hücre dışına atabilmektedir [24, 42].

Gram pozitif ve negatif bakterilerde bulunan sızdırma pompaları; bakteriyel hücrelerin metabolitlerini ve yan ürünlerini dışarı atmada kullanılan taşıyıcı sistemlerdir. Ancak zamanla antimikrobiyel ajanlar gibi diğer zararlı molekülleri de dışarı atma yönünde eğilim göstermişlerdir. Sızdırma sistemleri zor koşullarda bakteriyel canlılığa yardım ederler [1, 15]. Sızdırma pompalarının ortaya çıkışı özellikle biyosistlerin subletal konsantrasyonlarına maruz kalma durumunda tetiklenir. Sızdırma sistemleri üç bileşenli bir organizasyonla karakterize edilir. Bunlar; -stoplazmik membranla ilişkili olan membran füzyon proteini, -substratı membranın içinden dışına taşıyan taşıyıcı protein, -substratı dış membrana ulaştırılan dış membran proteindir. Burada kanal iç ve dış membranları geçer, ancak substrat doğrudan stoplazmadan dış ortama püskürtülür [15].

Sızdırma sistemleri antimikrobiyel ajanlara karşı hem doğal hem de kazanılmış direnç gösterirler. Sızdırma pompasının aşırı üretimi çoklu ilaç direncine neden olabilir. Bakteriyel sızdırma pompaları hedef modifikasyon ve antibiyotik inaktivasyonu gibi diğer direnç mekanizmaları ile kombine edilen çoklu ilaç direnci fenotipine eğilim gösterirler [37]. Bakteriyel biyofilmler bazı antibiyotiklerin (kloramfenikol ve tetrasiklin gibi) ve ksenobiyotiklerin (salisilat ve klorlanmış fenoller gibi) düşük konsantrasyonlarına maruz bırakıldıklarında çoklu ilaç direnci operonları ile sızdırma pompalarının (mar ve acr AB) açığa çıkarılmasını tetiklerler [13].

Sızdırma pompaları ilaç keşfindeki en önemli engeldir ve gram negatif bakterilerin çoklu ilaç direncindeki temel rol oynayırlardır. Sızdırma pompalarının anlaşılmasındaki son gelişmeler bakterideki ilaç keşif platformunu sağlayabilir [32].

SONUÇ

Biyofilmler antimikrobiyel etkisine karşı planktonik formları ile karşılaştırıldığında daha koruyucu ve dirençlidirler. Biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç

karmaşık ve çok yönlüdür. Etkin bir biyofilm kontrolü yapılmak isteniyorsa ilk olarak direnç mekanizmaları üzerinde durulmalı daha sonra gerekli önlemler alınmalıdır. Biyofilmlerdeki antimikrobiyel dirençte farklı mekanizmaların etkili olması biyofilm kontrolüne yönelik önlem alınırken birden fazla stratejinin birlikte uygulanmasını düşündürmüştür. Biyofilmlerin ekolojisini ve fizyolojisini algıladıkça daha etkin ve spesifik antibiyofilm bileşiklerinin ortaya çıkarılması mümkün olacaktır. Özellikle de glikokaliks veya sinyal molekülleri biyosentezini hedef alan antimikrobiyel ajanların geliştirilmesi önerilmektedir. Gıda endüstrisindeki biyofilmlerin önemi bilgi eksikliğinden dolayı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle de gıda endüstrisindeki gerek işletme hijyen ve sanitasyonu gerekse gıda güvenliği açısından biyofilmler ile ilgili çalışmalarda farklı antimikrobiyellerin direnç mekanizmaları üzerindeki etkinlikleri detaylı olarak incelenmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Dufour, D., Leung V., Lévesque C.M. (2012). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22, 2–16.
- [2] Sereno, M.J., Ziech, R.E., Druziani, J.T., Pereira, J.G., Bersot, L.S. (2017). Antimicrobial susceptibility and biofilm production by salmonella sp. strains isolated from frozen poultry carcasses. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(1), 103-108.
- [3] Xu, D., Jia, R., Li, Y., Gu, T. (2017). Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, 33, 97
- [4] Trachoo, N. (2003). Biofilms and the food industry. *Journal of Science and Technology*, 25(6), 807-815.
- [5] Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 249-253.
- [6] Houdt R.V., Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1117–1131.
- [7] Tan, S.Y.E., Chew, S.C., Tan, S.Y.Y., Givskov, M., Yang, L. (2014). Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 1–6.
- [8] Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 407-413.
- [9] Simoes, V., Simoes L.C., Vieira V.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573–583.
- [10] Bridier, A., Vizuete, P.S., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naitali, M., Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167-178.
- [11] Cahill, S.M., Desmarchelier, P., Fattori, V., Bruno, A., Cannavan, A. (2017). Global perspectives on antimicrobial resistance in the food chain. *Food Protection Trends*, 37(5), 353–360.
- [12] Paraje, M.G. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Edited by A. Mendez Vilas, Formatex.
- [13] Gilbert, P., McBain, A.J., Rickard, A.H. (2003). Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 245-248.
- [14] Jahid, I.K., Hu, S.D. (2012). A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 299-316.
- [15] Myszka, K., Czaczyk, K. (2011). Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. *Polish Journal of Food and Nutritional Science*, 61(3), 173-180.
- [16] Kumar, C.G., Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27.
- [17] Turhan, E.U., Metselaar, K.I., Abee, T. (2016). *Listeria monocytogenes*'in asit dirençli türlerinin benzalkonyum klorür direnci ve biyofilm oluşumu. Türkiye 12.Gıda Kongresi, Trakya Üniversitesi, 05-07 Ekim, 2016, Edirne, S136, 13s.
- [18] Turhan, E.U., Erginkaya, Z., 2016. Gıda endüstrisindeki biyofilmlerin önlenmesinde biyolojik yaklaşımlar. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016), 26-28 October 2016, Adana/Turkey.
- [19] Turhan, E.U., Erginkaya, Z., Uney, M.H., Ozer, E.A. (2017). Inactivation effect of probiotic biofilms on growth of *Listeria monocytogenes*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(4), 541-546.
- [20] Cappitelli, F., Polo, A., Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6, 29–42.
- [21] Verraes, C., Boxstael S.V., Meervenue, E.V., Coillie, E.V., Butaye, P., Catry, B., Schaetzen, M.A., Huffel, X.V., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., Block, J.D., Dewulf, J., Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 2643-2669.
- [22] Akan, E., Kınık, Ö. (2014). Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14, 42-51.
- [23] Gün, İ., Ekinci, F.Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyel yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.
- [24] Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Brissonnet, F.D. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- [25] Akbas, M.Y., Cag, S. (2016). Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *Food Science and Technology International*, 22(7), 587–597.
- [26] Langsrud, S., Sidhua, M.S., Heir, E., Holck, A.L. (2003). Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283-290.

- [27] Araujo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Edited by A. Mendez Vilas, Formatex Research Center, Badajoz.
- [28] Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- [29] Turhan, E.U, Kalkan, S., Erginkaya, Z. (2017). The use of phages for the removal of biofilms in the food industry. in: Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs, Edited by A. Méndez-Vilas , Formatex Research Center, Badajoz, pp.351-357.
- [30] Ünal E., Kalkan S., Erginkaya Z. (2010). "Use of Lactic Acid Bacteria Biofilms as Biocontrol Agents". Science and Technology Against Microbial Pathogens. Research, Development and Evaluation. Edited by A. Méndez-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz.
- [31] Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N. (2009). Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, 26, 592-597.
- [32] Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53-62.
- [33] Brooks, J.D., Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2163-2176.
- [34] Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386.
- [35] Ibusquize, P.S., Herrera, J.J.R., Cabo, M.L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 28, 418-425.
- [36] Davidson, P.M., Harrison, M.A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, 56(11), 69-78.
- [37] Mah, T.F.C., Otoole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39.
- [38] Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, 135-138.
- [39] Hoiby, N., Bjarnsholt T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322-332.
- [40] Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43: 573-583.
- [41] Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, J., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711-7717.
- [42] Çağlar, K. (2005). Dezenfektanlara Direnç Gelişim Mekanizmaları? Dezenfeksiyon İşlemini Ne Kadar Tehdit Etmektedir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 20-24 Nisan 2005, Samsun/Türkiye.
- [43] Meral, H., Korukluoğlu, M., 2014. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç mekanizmaları. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.
- [44] Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R., Steinberg, D. (2010). Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology*, 10, 51.
- [45] Özel B., Şimşek, Ö. (2017). Nisinin sinerjistik antimikrobiyel etkisi. *Akademik Gıda*, 15(3), 288-299.
- [46] Afnor Official Distributor of Standards, (2006). EN 1040, NF T 150. <https://www.boutique.afnor.org>.