



**BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN BAZI
VİRULANS, TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Leyla BİGEÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2015

Leyla BİGEÇ tarafından hazırlanan “BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN BAZI VİRULANS, TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan:Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye: Prof. Dr. Sumru ÇITAK

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

TezSavunmaTarihi: 04 / 06 / 2015

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

.....

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Leyla BİGEÇ

22.06.2015

BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN BAZI VIRULANS
TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Leyla BİGEÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2015

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara’da tüketime sunulan 100 balık örneği (50 tatlı su, 50 deniz) materyal olarak kullanılmıştır. Çalışılan 100 balık örneğinden *Enterococcus* izolasyonu gerçekleştirilerek, tür seviyelerindeki tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlamaları yapılan *Enterococcus* türlerinde; 4°C’de 20°C’de ve 37°C’de proteolitik aktivite; 30°C’de lipolitik aktivite, slime, biyofilm, jelatinaz, DNaz, hemoliz gibi bazı virulans özellikleri ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatın, %18,7’si *Enterococcus* spp., %16,7’si *E.casseliflavus*, %14’ü *E.flavescens*, %13,3’ü *E.gallinarum*, %8,7’si *E. raffinosus*, %8’si *E.solitarius*, %7,3’ si *E.pseudoavium*, %4’ ü *E.avium*, 4%’ü *E. faecalis*, %2’si *E.malodoratus*, %0,7’si *E. durans*, %0,7’si *E.mundtii*, %0,7’si *E.hirae*, %0,7’si *E. dispar*, %0,7’si *E. faecium*, olarak tanımlanmıştır. Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının, 102’si (%68) slime (+), 19’u (%12,7) jelatinaz (+), 128’i (%85,3) DNaz (+) ve 3’ü (%2) hemoliz (+)’dir. *Enterococcus* izolatlarının mikropate kullanılarak yapılan biyofilm değerlendirmesinde; Tryptic Soy Broth (TSB)’da 24 saat inkübasyon sonrası izolatların % 18,7’si kuvvetli pozitif, %52,7’si orta derecede pozitif, %24’ü zayıf pozitif ve %1,3’ü negatif biyofilm oluşumu gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı izolatların %2 glikoz içeren TSB’de 24 saat inkübasyon sonrası % 33,3’ünün kuvvetli pozitif, %40’ının orta derecede pozitif, %14,7’sinin zayıf pozitif ve %9,3’ ünün ise negatif biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Tatlı su balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* izolatları, (%32,9) eritromisin, (%19,2) gentamisin, (%24,6) teikoplanin, (%83,6) ampicilin, (%28,8) kloramfenikol, (%56,2) vankomisin, (%93,2) novobiosin, (%35,6) siprofloksosin, (%54,8) tetrasiklin, (%24,7) nitrofurantoin’e dirençli bulunmuştur. Deniz balığı örneklerinden izole edilen 77 *Enterococcus* izolatları ise (%64,9) eritromisin (%20,8) gentamisin, (%49,3) siprofloksosin, (%31,2) kloramfenikol, (%44,1) novobiosin, (%92,2) ampicilin, (%3,9) teikoplanin, (%44,1) vankomisin, (%68,8) tetrasiklin ve (%35,1) nitrofurantoin’e dirençli bulunmuştur. 150 *Enterococcus* izolatı’nın 4°C’de, 24’ü (%16) kuvvetli pozitif, 73’ü (%48,7) orta derecede pozitif, 26’sı (%17,3) zayıf pozitif proteolitik aktivite, 20 °C’de 31’i(%20,7) kuvvetli pozitif, 13’ü (%8,7) orta derecede pozitif, 4’ü (%2,7) zayıf pozitif proteolitik aktivite, 37 °C’de 42’si(%28) kuvvetli pozitif, 42’si (%28) orta derecede pozitif, 38’i(%25,3) zayıf pozitif proteolitik aktivite göstermiştir. Tüm *Enterococcus* izolatlarının 30 °C’de lipolitik enzim aktivite göstermemiştir.

Bilim Kodu : 203.1.010

Anahtar Kelimeler : *Enterococcus*, balık, virulans özellikler, antibiyotik direnci, biyoteknolojik

Sayfa Adeti : 115

Danışman : Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

VIRULENCE PROPERTIES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE AND TECHNOLOGICAL FEATURES OF *ENTEROCOCCUS* ISOLATED FROM FISH INVESTIGATION

(M.Sc. Thesis)

Leyla BİGEÇ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2015

ABSTRACT

In this study, 100 fish samples (50 freshwater, 50 seawater) which are provided for consumption in Ankara, were used as material. *Enterococcus* species were isolated from fish samples and identified. Identified *Enterococcus* species were analysed for proteolytic activity at 4°C, 20°C and 37°C, lipolytic activity at 30°C, some virulence properties as slime, biofilm, gelatinase, DNase, hemolysis and antibiotic resistance with Kirby-Bauer disk diffusion method were researched. The distribution rates among 150 *Enterococcus* isolated from fishes were %18,7 *Enterococcus* spp., %16,7 *E. casseliflavus*, %14 *E. flavescens*, %13 *E. gallinarum*, %8,7 *E. raffinosus*, %8 *E. solitarius*, %7,3 *E. pseudoavium*, %4 *E. avium*, %4 *E. faecalis*, %2 *E. malodorans*, %0,7 *E. durans*, %0,7 *E. mundtii*, %0,7 *E. hirae*, %0,7 *E. dispar* and %0,7 *E. faecium*. In our research, 102 (68%) slime (+), 19 (12,7%) gelatinase (+), 128 (85,3%) DNase (+) and 3 (2%) hemolyses (+) are in 150 *Enterococcus* isolated from the fish samples. By using microplate method all *Enterococcus* isolates after 24 hours of incubation on tryptone soy broth %18,7 strong biofilm, %52,7 medium positive, %24 weak positive and %1,3 negative biofilm formation have been identified. On the same isolates 2% glucose containing the TSB after 24 hours of incubation in %33,3 strong biofilm, %40 medium positive, %14,7 weak positive and %9,3 negative biofilm formation have been identified. The distribution of antibiotic resistances of *Enterococcus* isolates (freshwater fish samples) was (32.9 %) erythromycin, (35.6%) ciprofloxacin, (83.6%) ampicillin, (54.8%) tetracycline, (56.2%) vancomycin, (24.7%) nitrofurantoin, (93.2%) novobiocin, (19.2%) gentamicin, (24.6%) teicoplanin, (28.8%) chloramphenicol. The distribution of antibiotic resistances of *Enterococcus* isolates (seawater fish samples) was (64.9%) erythromycin, (49.3%) ciprofloxacin, (92.2%) ampicillin, (68.8%) tetracycline, (44.1%) vancomycin, (35.1%) nitrofurantoin, (44.1%) novobiocin, (20.8%) gentamicin, (3.9%) teicoplanin, (31.2%) chloramphenicol. From 150 *Enterococcus* isolates, 24 of the isolates (16%) strong positive, 73 of the isolates (48,7%) medium positive, 26 of the isolates (17,3%) weak positive have been identified proteolytic activity at 4°C. 31 of the isolates (20.7 %) strong positive, 13 of isolates (8.7%) medium positive, 4 of the isolates (2.7%) weak positive have been identified proteolytic activity at 20°C. 42 of the isolates (28%) strong positive, 42 of isolates (28%) medium positive, 38 of the isolates (25.3%) weak positive have been identified proteolytic activity at 37°C. None of *Enterococcus* isolate were shown 30 °C lipolytic enzyme activity.

Science Code : 203.1.010

Key Words : Fish, *Enterococcus*, Virulence, Antibiotic

Page Number : 115

Supervisor : Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN'a, yine çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini yanımda hissettiğim Prof. Dr. Sumru ÇITAK, Prof. Dr. Nihal YÜCEL, Yrd. Doç. Dr. Ebru YILMAZ ve Araş. Gör. Meryem Burcu KÜLAHÇI'ya, çalışma sürecim boyunca yanımda olup yardımlarını ve dostluklarını benden esirgemeyen Sinem AKYILDIZ'a, Ece ÖZGAN'a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olup maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen babam Turgut BİGEÇ'e, annem Hürriyet BİGEÇ'e, ağbilerim Nazir BİGEÇ ve Mustafa BİGEÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. Balıkların Mikroflorası	7
2.2. <i>Enterococcus</i> 'lar Hakkında Genel Bilgi	9
2.3. <i>Enterococcus</i> 'ların Genel Özellikleri	12
2.3.1. Bazı <i>Enterococcus</i> türlerinin özellikleri	14
2.3.2. <i>Enterococcus</i> türlerinin epidemiyolojisi	15
2.4. <i>Enterococcus</i> ' ların Gıda Ürünleriyle İlişkisi	16
2.5. Biyoteknolojik Özellikleri.....	22
2.5.1. Proteolitik enzim aktivitesi.....	22
2.5.2. Lipolitik enzim aktivitesi	24
2.6. <i>Enterococcus</i> Türlerinin Virülans Faktörleri	26
2.7. <i>Enterococcus</i> 'larda Antimikrobiyal Direnç	30
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. Balık Örneklerinden İzole Edilen <i>Enterococcus</i> 'ların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Yöntemler.....	41
3.1.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması	41
3.1.2. Balık örneklerinden <i>Enterococcus</i> izolasyonu	41

Sayfa

3.2. <i>Enterococcus</i> İzolasyonu Ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri Ve Testler	42
3.2.1. Azide dekstrozo broth (Oxoid CM 868)	42
3.2.2. Peptonlu su (Oxoid CM 9)	42
3.2.3. Slanetz Bartley besiyeri (LAB 166).....	43
3.2.4. Blood agar base (Oxoid CM 331).....	43
3.2.5. Gram boyama yöntemi.....	44
3.2.6. Katalaz testi	44
3.2.7. %6,5 NaCl'li buyyon	44
3.2.8. 10°C'de ve 45°C'de üreme	45
3.2.9. Eskülin hidrolizi	46
3.2.10. PYR (pyrolidonyl arylamidase) testi (Oxoid ID0580).....	47
3.2.11. Hareket testi.....	48
3.2.12. Arjinin hidrolizi	49
3.2.13. Karbonhidrat fermentasyon testi.....	50
3.3. <i>Enterococcus</i> Türlerinin Virulans Faktörleri	51
3.3.1. Jelatin hidroliz testi.....	51
3.3.2. DNaz testi.....	51
3.3.3. Hemoliz testi.....	52
3.3.4. Biyofilm oluşumunun araştırılması	53
3.4. <i>Enterococcus</i> Türlerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi	56
3.5. <i>Enterococcus</i> Türlerinin Biyoteknolojik Özelliklerinin Araştırılması	59
3.5.1. Balıklardan izole edilen <i>Enterococcus</i> 'ların proteolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi	59
3.5.2. Balıklardan izole edilen <i>Enterococcus</i> 'ların lipolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi	60

	Sayfa
4. BULGULAR.....	61
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ.....	115

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Enterococcus</i> cinsi içerisinde yer alan türler.....	10
Çizelge 3.1. Gram pozitif kok ve kokobasillerin ayrımında kullanılan testler	51
Çizelge 3.2. <i>Enterococcus</i> Türleri İçin Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Duyarlılık Sınırları	57
Çizelge 4.1. Çalışılan balık örneklerinin dağılımı	61
Çizelge 4.2. Bağırsak ve solungaçtan izole edilen tatlı su ve deniz balıklarının dağılımı	61
Çizelge 4.3. Bağırsak ve solungaçtan izole edilen <i>Enterococcus</i> ların dağılımı	62
Çizelge 4.4. Tatlı su Balıklarından İzole Edilen <i>Enterococcus</i> Türleri	63
Çizelge 4.5. Deniz Balıklarından İzole Edilen <i>Enterococcus</i> Türleri.....	63
Çizelge 4.6. Tatlı su balıklarından izole edilen slime (+) ve slime (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları.....	64
Çizelge 4.7. Deniz balıklarından izole edilen slime (+) ve slime (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları.....	65
Çizelge 4.8. Balık örneklerinden izole edilen slime (+) ve slime (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları.....	66
Çizelge 4.9. Tatlı su balıklarından izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerinin biyofilm oluşumları.....	67
Çizelge 4.10. Deniz balıklarından izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerinin biyofilm oluşumları.....	68
Çizelge 4.11. Tatlı su balıklarından izole edilen jelatinaz (+) ve jelatinaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	70
Çizelge 4.12. Deniz balıklarından izole edilen jelatinaz (+) ve jelatinaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	71
Çizelge 4.13. Balık örneklerinden izole edilen jelatinaz (+) ve jelatinaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	71
Çizelge 4.14. Tatlı su balıklarından izole edilen Dnaz (+) ve Dnaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	72
Çizelge 4.15. Deniz balıklarından izole edilen Dnaz (+) ve Dnaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	72

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. Balık örneklerinden izole edilen DNaz (+) ve DNaz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları	73
Çizelge 4.17. Tatlı su balıklarından izole edilen Hemoliz(+) ve Hemoliz(-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları.....	73
Çizelge 4.18. Deniz balıklarından izole edilen Hemoliz (+) ve Hemoliz (-) <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımları.....	74
Çizelge 4.19. Balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerinin hemoliz (+) ve hemoliz (-) dağılımları.....	74
Çizelge 4.20. Tatlı su balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> 'ların antibiyotik dirençlilikleri.....	76
Çizelge 4.21. Deniz balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> 'ların antibiyotik dirençlilikleri.....	77
Çizelge 4.22. Balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerininin 4°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları.....	78
Çizelge 4.23. Balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerininin 20°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları.....	79
Çizelge 4.24. Balık örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> türlerininin 37°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları.....	79

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. 1. Araştırmamızda çalışılan Tatlı Su Balıkları.....	2
Şekil 1. 2. Araştırmamızda çalışılan Deniz Balıkları.....	4

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1. Sazan.....	3
Resim 1.2. Somon	3
Resim 1.3. Alabalık.....	3
Resim 1.4. Levrek	5
Resim 1.5. Palamut	5
Resim 1.6. Çipura.....	5
Resim 2.1. Enterococcus'un mikroskopik görüntüsü	13
Resim 2.2. Enterococcus'un Slanetz-Bartley besiyerindeki görüntüsü	13
Resim 3.1. Katalaz Testi.....	44
Resim 3.2. %6,5'luk NaCl'de Üreme Testi.....	45
Resim 3.3. 10°C'de ve 45°C'de Üreme Testi	46
Resim 3.4. Eskülin hidrolizi testi (pozitif)	47
Resim 3.5. Hareket Testi (Pozitif Sonuç)	48
Resim 3.6. Arjinin Hidrolizi Testi	49
Resim 3.7. Karbonhidrat Fermentasyon Testi	50
Resim 3.8. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücresinin tuttuğu boyanın geri çözdürülmesi	55
Resim 3.9. Kongo kırmızılı agarda slime faktörünün tespit edilmesi.....	56
Resim 3.10. <i>Enterococcus</i> 'larda Antibiyotik Duyarlılık Testi	58
Resim 3.11. Proteolitik Enzim Aktivitesi Testi (Pozitif Sonuç)	59
Resim 3.12. Lipolitik Enzim Aktivitesi Testi.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
μ	Mikron
μg	Mikrogram
Cfu	Colony forming unit
dk	Dakika
gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit
Lt	Litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normal
NaCl	Sodyum klorür
°	Derece
°C	Derece Santigrat
Ph	Asitlik değeri
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar	Açıklamalar
ARE	Antibiyotiğe Dirençli <i>Enterococcus</i>
ATM	Atmosfer Basıncı
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Instute
DEĞ	Değişken
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dnaz	Deoksiribonükleaz
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>

Kısaltmalar	Açıklamalar
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EMS	En Muhtemel Sayım Yöntemi
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Glikopeptite Dirençli <i>Enterococcus</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
HCl	Hidroklorik asit
KOH	Potasyum Hidroksit
LAP	Lösinaminopeptidaz
VRE	Vankomisine Dirençli <i>Enterococcus</i>
VREF	Vankomisine Dirençli <i>Enterococcus faecium</i>

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan su ürünlerinin tüketiminde bir artış görülmektedir. Ancak, protein, esansiyel yağ asitleri ve mineral madde açısından oldukça zengin besinler olan su ürünleri özellikle biyolojik ve mikrobiyolojik açıdan kontamine sularda avlanmış ya da yetiştirilmiş ise gıda güvenliğini ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Su ürünleri kaynaklı zehirlenmelerde; su ürününün kendisi patojen mikroorganizmalar, mikroorganizma toksinleri, algal toksinler ve ağır metaller etken olabilir.

Patojen mikroorganizmalar ya da mikrobiyal toksinlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri dünya genelinde insan sağlığını tehdit etmektedir.

Gıda kaynaklı rahatsızlıklar; toksik ya da enfeksiyöz, gıda veya su tüketiminin neden olduğu düşünülen hastalıklardır [1].

Gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde 76 milyon hastalık olgusunun meydana geldiği ve bunların 5 milyonunun ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir [2].

Ülkemizde ise 1995- 2004 yılları arasında 83, 363 hasta, gıda zehirlenmeleri vakaları nedeniyle hastanelerde tedavi görmüş, 1377'si hayatını kaybetmiştir [3].

Pek çok dünya ülkesinde su ürünleri, gıda zincirinde çok önemli bir yere sahiptir. Bazı bölgelerde ise ana gıda durumundadır [4].

Yaşamın devamı ve sağlıklı beslenmemiz için gerekli olan gıdaların hijyenik ve ekonomik olmasının yanı sıra protein, yağ, karbonhidrat, vitaminler ve mineral maddeleri dengeli ve yeterli bir şekilde içermesi de arzu edilmektedir. Bu isteğe cevap veren en önemli gıda gruplarından biri de su ürünleri olup, bu gıda grubu içinde ön sırayı balık almaktadır [5].

Halk sağlığı ele alındığında tüketilmesi ön görülen balıkların mikrobiyolojik açıdan bazı hijyen parametrelerini taşıması gerekmektedir.

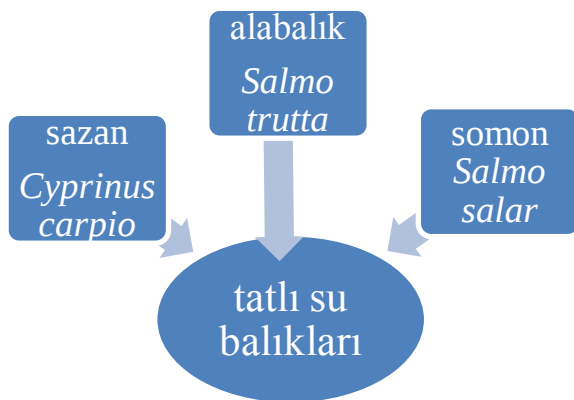
Balıkların kas dokularının diğer memeli hayvanlara oranla çok daha hızlı bozulması, avlanmadan tüketilinceye kadar geçen sürede mikroorganizmaların ve diğer etkenlerin etkisine maruz kalmasından dolayı balık eti, tazeliğini ve kalitesini kaybedebilmektedir [6].

Balık etinin beslenmedeki önemine karşılık, gerek yapısal özellikleri gerekse fiziksel ve fizikokimyasal bazı nitelikleri kolay ve çabuk bozulmasına neden olabilmektedir. Balık etinin 6,4-6,8 pH ve 0,98 su aktivitesi (aw) değerlerine sahip olması patojen ve bozulmaya yol açan bakterilerin üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır [7].

Yakın geçmişe kadar balıklar için 15-20 bakteri türü patojen etki gösterirken, sonraki yıllarda enfekte olmuş balıklarda 70'e yakın bakteri türü izole edilmiştir [8,9]. Genellikle temiz sularda avlanan balık ve yenilebilen diğer su ürünleri oldukça düşük oranda bakteri taşımaktadır. Ancak avlama sırasında ve sonrasında yüzeysel bakteri sayısı önemli ölçüde artar [10]. Balıkların mikroflorası, balığın cinsi, yaşadığı sular, mevsim ve gelişim dönemine göre farklılık gösterir. Balıkların derisinde, solungaçlarında, barsak içeriğinde ve çevrede bulunan mikroorganizmalar primer kontaminasyonlara neden olurken; işleme, taşıma ve pazarlama aşamalarında ise sekonder kontaminasyonlar oluşabilir. Bu mikroorganizmalar balıklarda bozulmalara ve gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olmaktadır [11].

Tatlısu balıkları bakımından zengin olan ülkemizde, tatlısu göllerinin olduğu bölgelerde balıkçılık ve turizm gelişmiştir. Türkiye'de 40'nın üzerinde tatlısu balığı türü mevcuttur.

Araştırmamızda çalışılan tatlı su balıkları şu şekilde sıralanabilir:



Şekil 1. 1. Araştırmamızda çalışılan Tatlı Su Balıkları

Göl alabalığı: Kuzeybatı Anadolu, Abant ve Yedi Gölle Bölgesi'nde yayılış gösterir. Çeşitli türleri vardır. Türüne göre renk, boy ve beslenme farklılıkları gösterir. Genelde temiz, bol oksijenli soğuk sularda fazla gezinmeden planktonlar, dip hayvanları ve küçük balıklarla beslenerek yaşar. Boyu ortalama 25-40, yabanlarında 60-70 cm olabilir. Eylül-Ocak ayları arasında ürer ve yumurtalarını dipteki çakıllara yapıştırır. Üretimi yapılmayan, eti çok lezzetli olan göl alabalığının ekonomik değeri bölgeseldir.

Somon: Anavatanı Kuzey Amerika'dan dünyaya yayılmış, üretilmek üzere ülkemize getirilmiştir. Boyu ortalama 60-100 cm, ağırlığı da 3-15 kg olabilir. 150 cm'ye ulaşanları da olur. Hızlı akarsuların oksijeni bol, temiz sularında yaşar.

Doğal yetişenleri 2-3 m yükseğe atlaya sıçraya yüzerek 2-3 bin km'lik nehir kaynaklarına ulaşır, burada Ekim-Kasım ayları arası ürer. Yavrular tekrar acılara iniş yapar. Yetişkinleri denize de uyum gösterir. Etoburdur. Böcekler, sinekler, kabuklular ve irili ufaklı balıklarla beslenir. Tatlısu balıklarının eti en lezzetli olanıdır. Ayrıca yumurtasından kırmızı havyar elde edilir. Ekonomik değeri çok yüksektir.

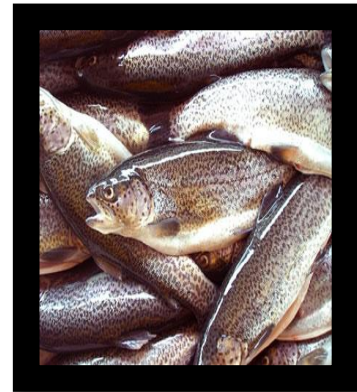
Sazan balığı (*Cyprinus carpio*), sazangiller (*Cyprinidae*) familyasına adını veren tatlısu balığı. Göl ve yavaş akan derelerde bulunur. Uzun gövdeli, solucan, böcek larvaları ve bitkilerle beslenen bir dip balığıdır. Ömrü 40-50 yıla kadar varabilir. Türkiye'nin akdeniz ve güneydoğu bölgesi haricinde her yerinde bulunur. Ancak, Akdeniz Bölgesinin en önemli akarsularından olan Göksu Irmağı'nda bol miktarda sazan yaşamakta ve ağırlıkları 10-12 kilograama ulaşabilmektedir [12].



Resim 1.1. Sazan [12]

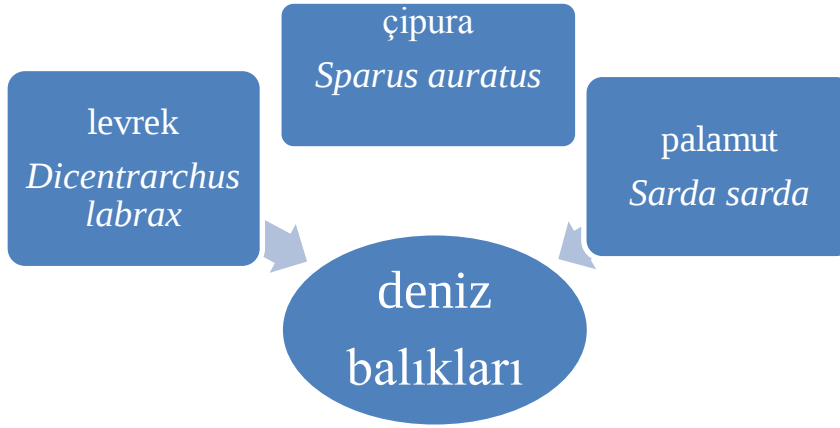


Resim 1.2. Somon [13]



Resim 1.3. Alabalık [14]

Araştırmamızda çalışılan deniz balıkları ise;



Şekil 1. 2. Araştırmamızda çalışılan Deniz Balıkları

Palamut/Torik (*Sarda sarda*): Karadeniz ve Marmara'nın en ünlü balığıdır. Bahar aylarında beslenmek için Karadeniz'e çıkıp, sonbahardan itibaren kışlamak için Marmara'ya, Çanakkale'ye kadar iner. Süratli ve iyi yüzücüdür. Sürü halindeki uskumru, kolyoz, istavrit, hamsi, sardalya gibi balıklara saldırarak yer. 18-20° C. sularda 400,000'den birkaç milyona kadar yumurta dökerek açık denizde ürer. Yetiştikten sonra büyümesine göre küçüklerine Vanoz-Gaco, 10-25 santimetre çingene palamudu, 30-35 santimetre palamut, 40-45 santimetre kestane palamudu, 50-55 santimetre zindandelen, 55-60 santimetre torik, 60-65 santimetre sivri, 65-70 santimetre altıparmak, 70 santimetre ve üstü peçuta olarak adlandırılır. Taze tüketimi, ihraç ve endüstri yönleriyle çok değerli olan bu balığın üretimindeki azalma, ekonomik değerini tehlikeli boyutlara indirmektedir [20].

Levrek (*Dicentrarchus labrax*): Denizlerimizde ve denizlerin nehirlerle karışımı acı su bölgelerinde yaşar. Fazla gezici olmayan levrek, yerli balıklardan sayılır. Gençken gruplar halinde, sonraları tek başına yaşar. Yaşam ortamı, karanlık ve kuytu yerlerdir. Bu nedenle gemi batıkları veya kaya oyuklarında yuvalanır. Yaklaşık 20 yıllık yaşamı olabilen levrek, ortalama 50-60 santimetreden 1 metre boy ve 10-12 kilogram ağırlığa erişebilir. 40 santimetreden küçüklerine ispendek denir.

Küçük yavru balıklarla beslenir. Ocak-mart arasında 500 000-2 000 000 yumurta dökerek, yüksek bir üreme gösterir. Eti en lezzetli balıkların başında gelir. Bu nedenle de ekonomik değeri çok yüksektir.

Çipura (*Sparus auratus*): Ege ve Akdenizin bu namlı balığı Marmarada seyrek bulunur. Ortalama 25 – 35 cm boy ve 0,5 – 3 kg ağırlıkta, en çok 60 cm ve 6 kg’da olabilir. Etçil bir balıktır. Kuvvetli çenesiyle küçük kabukluları, balıkları ve diğer hayvanları kolayca yer. Yaz devresinde sığılarda, kış aylarında da 35 – 40 m derinliklerde yaşar.

İki yaş üstündekiler daha da derinlere iner. Üremeleri Ekim – Aralık aylarında olur. 100 000 – 150 000 yumurta döker. Eti çok lezzetlidir. Ayrıca üretim kültürüne uygunluğu nedeniyle ekonomik değeri çok yüksektir [15].



Resim 1.4. Levrek [16]



Resim 1.5. Palamut [17]



Resim 1.6. Çipura [18]

Günümüzde balık yetiştiriciliği önemli bir sektör haline gelmiştir. Son yıllarda balık hastalıklarında görülen sporadik ve epidemik infeksiyonların önemli bir kısmının Gram pozitif koklardan kaynaklandığı saptanmıştır. Yapılan taksonomik çalışmalarda balık hastalıklarına neden olan farklı Gram pozitif kok türleri bulunduğu belirtilmiştir. Bu türlere örnek olarak *Streptococcus iniae*, *S. difficile*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Enterococcus seriolicida* verilmiştir [19].

Balık orjinli streptokok ya da enterokokların özelliklerini gösteren Gram pozitif koklar arasında oldukça yüksek düzeyde fenotipik heterojenite bulunmuştur. Eldar ve ark [20], alabalıklardan fenotipik ve serolojik özelliklerine göre *Enterococcus* türleri izole etmişlerdir. Enterokoklarda infekte balıklarda septisemi ve ölümler görüldüğü bildirilmiştir [21]. *Enterococcus seriolicida* tatlı su balıklarında septisemik infeksiyona neden olmaktadır [22].

Araştırmamızda gram pozitif bakterilerden olan *Enterococcus*'ların balıklardan izolasyonu ve tanımlaması yapılmıştır.

Enterococcus'lar, insan ve hayvanlarda normal intestinal florada bulunan bakterilerdir ve hayvanlardan elde edilen besin ürünlerinde olduğu gibi insan ve hayvan kaynaklı fekal materyaller tarafından (kanalizasyon ve hayvan gübresi gibi) kontamine olmuş çevrelerde de yaygındırlar [23, 24].

Enterococcus'lar primer patojenler olarak değerlendirilmezler ancak antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterme yeteneklerine bağlı olarak dünya çapında nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmaktadırlar [24, 25].

Enterococcus'lar, ısıya dayanıklı olmaları sebebiyle ısı uygulanmış, yarı steril edilmiş ve işlenmiş etler gibi steril olmayan yiyeceklerde spor formlarla birlikte yaşayabilen mikroorganizmalardır. Örneğin sütlerde düşük ısıda uzun zaman pastörizasyon işleminden sonra yaşayabilirler. Kutulanmış, dilimlenmiş ve daha önce paketlenmiş jambonlarda bozulmaya neden olan ajanlardır. Fermente sucuklarda 106 cfu/gr seviyesinde, bazende daha fazla oranda bulunabilirler [24, 26].

Enterococcus'lar, sahip oldukları antimikrobiyal dirençli genlerini, plazmid ve transpozonlar aracılığı ile ekosistem içerisinde, insanlar için patojen olan *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus* spp. ve *Streptococcus* spp. gibi gram pozitif bakterilere transfer edebildikleri ortaya konulmuştur [27, 28, 29, 30].

Bu çalışmada balık örneklerinden (bağırsak ve solungaç) *Enterococcus* izolasyonu, izole edilen izolatların tanımlanması, bazı virulans faktörlerinin oluşumu, biyoteknolojik özellikleri ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda Ankara'nın çeşitli marketlerinden toplanan 22 alabalık (*Salmo trutta*), 21 deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*), 21 somon (*Salmo salar*), 22 çipura (*Sparus auratus*), 7 palamut (*Sarda sarda*), 7 sazan (*Cuprinus carpio*) olmak üzere 100 balıktan *Enterococcus* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen *Enterococcus* türleri tanımlanmıştır. Tanımlanan bu izolatların slime, jelatinaz, DNaz ve hemoliz gibi bazı virulans özellikleri araştırılmıştır. Bu örneklerden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarına bakılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Balıkların Mikroflorası

Hızlı sanayileşme, nüfustaki hızlı artış ve kentleşme, yetersiz altyapı ve sanayi kuruluşlarında büyük oranda arıtma tesislerinin bulunmaması önemli bir çevre kirliliğine neden olmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde evsel ve endüstriyel atıkların yeterince arıtılmadan nehir, göl ve deniz gibi alıcı ortamlara verilmesi ekolojik sistem için ciddi problemler oluşturmaktadır [31].

Besleyici değeri yüksek olan balık etinin nötre yakın pH değeri, kanının iyi akıtılamaması, iç organlarının hemen çıkarılmaması, bağdoku bakımından zayıf ve deri yüzeyinin ıslak olması gibi nedenlerle kasaplık hayvanlara göre daha fazla bozulma ve sağlık için tehlike oluşturmaları olasıdır [32].

Balık ve su ürünleri, günümüzde tüketilen proteinli yiyeceklerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Yapılan denemeler protein dışında balık ve su ürünlerinde önemli miktarda vitamin ve mineral madde bulunduğunu ve bu ürünlerin beslenme değerinin yüksek olduğunu göstermiştir [33].

Yüksek besin değerine sahip olan bu ürünler mikrobiyal bozulmalara karşı çok duyarlıdır [34]. Balıklarda bakteriyel floranın bilinmesi, potansiyel olarak hastalık oluşturma yeteneğindeki fırsatçı patojen bakterilerin varlığını belirleme imkanı sağlar [35].

Canlı balığın florası içinde yaşadığı suyun mikrobiyal içeriğine bağlı olarak değişir. Örneğin, temiz sularda yeni yakalanmış balıklarda mikrobiyal kontaminasyon sınırlıdır. Bu durum yakalandığı ortamın kirlilik durumuna, sıcaklığına, balığın yakalama şekline ve avlanmadan sonra yapılan işlemlere bağlıdır.

Avlanma sahasının mikrobiyal kalitesinin düşük oluşu balıkçıların ve satış personelinin hijyen ve sanitasyon konularında yeterince aydınlatılmaması gibi sebeplerden dolayı balıklar kontaminasyona uğramaktadır. Bu kontaminasyon önlenmediği zaman çeşitli besin zehirlenmelerine yol açmakta ve insan sağlığını tehdit edebilecek boyutlara ulaşmaktadır.

Balıkların bozulma süreleri diğer kasaplık hayvan etlerine oranla daha kolaydır bu nedenle soğukta muhafazası önemlidir [17, 36].

Balık ve diğer su ürünleri suda bulunan mikroorganizmalar ile taşıma ve işleme sırasında bulaşabilecek birçok mikroorganizmayı içerir. Kırmızı etlerde olduğu gibi balık ve diğer su ürünlerinde de otolitik, oksidatif ve bakteriyel aktivite sonucu çeşitli bozulmalar meydana gelir. Ancak taze balık etlerinde otolitik aktivite ve pH kırmızı etlere göre daha yüksek olduğundan, bu ürünlerde otolitik ve bakteriyel bozulma daha fazladır.

Balıklarda meydana gelen bozulmanın hızı aşağıdaki faktörlere bağlıdır [36]:

- 1) Balık çeşidi: Balık çeşidi ile balıkların bozulma hızı arasında ilişki bulunmaktadır. Örneğin, yassı balıklar rigor mortise(ölüm katılığı) daha hızlı geçtikleri için yuvarlak balıklara kıyasla daha çabuk bozulurlar. Ancak kalkan balığı yassı balık olmasına rağmen, pH'sı düşük olduğu için daha uzun süre saklanabilir. Bazı yağlı balıklar doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu hızlı bir şekilde bozulurlar. Trimetilamin oksitçe zengin balıklarda bakteriyel ve enzimatik aktivite sonucu tipik bayat balık kokusu olan trimetilamin oluşur.
- 2) Balığın yakalandığı andaki durumu: Balığın yakalanması sırasında fazla mücadele etmesi ve oksijen azlığı sonucunda balığın glikojen kaynakları hızlı bir şekilde tükenir. Bu durumda kas dokuda pH düşüşü daha az olur ve bozulmaya karşı duyarlı hale gelir. Ayrıca yakalandığı sırada barsakları dolu olan balıklar, boş olanlara kıyasla daha hızlı bozulurlar.
- 3) Bakteriyel bulaşmanın düzeyi: Çamur, su, işçiler, balığın yüzeyindeki kaygan tabaka ve barsak içeriği kontaminasyon kaynaklarını oluşturur. Mikroorganizmalar solungaçlardan geçerek vasküler sistem aracılığıyla dokulara veya barsaklardan vücut boşluğuna geçebilirler. Ayrıca işçilerin ellerinden, alet ve ekipmanlardan yoğun bulaşma söz konusudur.

Ancak iyi bir yıkama bulaşan bakterilerin çoğunu uzaklaştırır, bunu izleyen yeterli soğutma kalan bakterilerin gelişmesine engel olur. Balığın derisinde meydana gelebilecek zedelenmeler de bozulmayı hızlandırır.

- 4) Sıcaklık: Bakteriyel gelişmeyi önlemek veya geciktirmenin en etkin yolu balığın soğutulmasıdır. Soğutma mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde yapılmalı (0 ile -1°C) ve bu düşük sıcaklık muhafaza edilmelidir. Hızlı dondurma işlemi ise balığın muhafazasında daha etkili bir yöntemdir.

Balıklarda bozulmaya genellikle balık yüzeyindeki kaygan tabaka ve barsaklarda bulunan doğal flora neden olmaktadır.

Bozulmaya neden olan hakim flora balığın bekletildiği sıcaklığa göre değişkenlik göstermektedir. Düşük sıcaklıklarda tutulan balıklarda başlıca *Pseudomonas* türleri ile birlikte *Achromobacter* ve *Flavobacterium* türleri bozulmaya neden olmaktadır. Daha yüksek sıcaklıklarda ise *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Sarcina* ve *Clostridium* türleri gelişebilir.

Bakteri önce yüzeyde gelişir daha sonra dokulara girer. Balığın bünyesinde meydana gelen otolitik değişimler sonucu bakteriyel gelişme için gerekli olan azotlu bileşiklerde artış görülür.

Dokularda gelişen bakteri bu bileşiklerden trimetilamin, amonyak, amin bileşikleri, hidrojen ve diğer sülfür bileşikleri, merkaptan, indol gibi kötü kokulu ürünler oluşturur [36, 37].

Balık yolu ile insanlarda görülen hastalıkların oranı, Avusturya'da %12, Kanada'da %5,8 İngiltere ve Amerika'da %0,5 olarak bildirilmiştir [38].

Balıklarda patojenik mikroorganizmaların vücuda giriş yapabilme noktaları arasında deri, solungaçlar ve sindirim kanalı yer almaktadır [39]. Canlı ya da taze balıkların yüzeyinde 10^2 - 10^7 /cm² solungaç dokusunda 10^3 - 10^6 /g bağırsakta ise 10^3 - 10^8 /g canlı mikroorganizma bulunur [40].

2.2. *Enterococcus*'lar Hakkında Genel Bilgi

Enterococcus izolasyonu ilk olarak 1899 yılında Fransız mikrobiyolog Thiercelin tarafından yapılmıştır. 1906 yılında, izolatın adı Andrewes ve Horder tarafından *Streptococcus faecalis*(*S.faecalis*) olarak değiştirilmiştir.

Lancefield'in 1933 yılında yaptığı serolojik tiplendirme sistemine göre Enterococci grup D'ye karşı presipitasyon reaksiyonu vermişlerdir. 1937 yılında ise *Streptococcus*'lar, 4 gruba ayrılmış ve terim olarak *Enterococcus*, fekal *Streptococcus* ve grup D *Streptococcus* eş anlamda kullanılmıştır. *S.faecalis* ve *S. faecium*'un *Streptococcus* genusundan değişik bir genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle farklı bir genusa alınmalarını ilk olarak 1970 yılında Kalina adında bir bilim adamı önermiştir. 1984 yılında ise bu *Streptococcus* türleri Schleifer ve Kilpper-Balnz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır [41].

Son yıllarda *Enterococcus* cinsinin taksonomisinde dikkati çeker değişiklikler olmuş, *Enterococcus* cinsi *Streptococcus* cinsinden ayrılarak ayrı bir cins olarak tanınmaya başlanmıştır. *S. faecalis* ve *S. faecium*'un ve diğer türlerden farklı olduğu ve yeni bir cins içerisinde değerlendirilmesi gerektiği görüşü 1984'te Schleifer ve Kilpper Balnz'ın moleküler çalışmalarıyla da desteklenmiştir.

Diğer *Enterococcus* türleri de bu yeni tanımlanan cins içerisine dahil edilmiştir [42, 43]. *Enterococcus* türleri karşılaştırıldığında son zamanlarda tanımlanan türlerin fizyolojik ve biyokimyasal davranışlarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bunlar 16S rRNA dizilimlerine göre 26 tür olarak tanımlanmıştır. Günümüze kadar tanımlanmış olan 26 *Enterococcus* türü Çizelge 2.1'de sunulmuştur [44].

Çizelge 2.1. *Enterococcus* cinsi içerisinde yer alan türler [44]

<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. mundtii</i>
<i>E. porcinus</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. casseliflavus</i>
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. ratti</i>
<i>E. flavescens</i>	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. solitarius</i>
<i>E. columbae</i>	<i>E. gilvus</i>	<i>E. hirae</i>	
<i>E. villorum</i>	<i>E. pallens</i>	<i>E. moraviensis</i>	

Enterococcus'lar hemen her zaman, her yerde bulunabilen mikroorganizmalardır [45].

Enterococcus'lar hayvansal kaynaklı gıdalarda potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Hatta hayvansal gıdalar bu tür patojen mikroorganizmaların gelişebilmesi için mükemmel bir besi ortamıdır. Çiğ et tüketiciye ulaşınca kadar herhangi bir işlem görmemektedir. Özellikle salamura et ve fermente et ürünlerinde genellikle ısısal işlem uygulanmamaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak et ve et ürünleri, insanlara geçen gıda kaynaklı birçok hastalıkta en önemli gıda grubunu oluşturmaktadır [46].

Enterococcus'lar pek çok yararlı özellik taşıırken potansiyel patojenik özellikler de sergileyebilirler. Bu mikroorganizmalar starter kültür olarak yararlı rol oynarlarken, diğer taraftan da bazı süt ürünlerinde *Enterococcus*'ların fekal orijinli olanları hakkında kuvvetli bir soru işareti vardır. Fermente gıdalardan izole edilen *Enterococcus*'ların potansiyel veya araştırılan patojeniteleri üzerine; hayvan model sistemlerinde daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Enterococcus içeren gıdaların sağlık riski olmaksızın tüketiminin uzun bir tarihi olmasına karşın *Enterococcus*'ların GRAS (Generally Recognised As Safe) mikroorganizma olarak kabul edilmesi çok daha fazla çalışmayı gerektirmektedir [45,47].

Gıdalar üzerinde gelişen bazı mikroorganizmalar proteinleri hidrolize ederek tat ve koku bileşenleri üzerinde olumsuz etkiye neden olabilirler.

Psikrotrofik mikroorganizmalardan bazıları kuvvetli proteolitik özellikleri nedeniyle süt, et ve dondurulmuş gıdalar üzerinde istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle depolama süresi boyunca bu mikroorganizmalar çoğalmakta ve bazen gıdaları tüketemeyecek hale getirmektedir. Diğer yandan peynir, fermente et gibi bazı gıdaların olgunlaşması ve yapıların istenen düzeyde gelişmesi, mikrobiyel proteolitik aktivitenin bir sonucudur [45].

Gıda maddelerinin birçoğu lipit içermektedir. Süt, krema, tereyağ, beyaz peynir gibi bazı gıdalarda meydana gelen mikrobiyel lipoliz üründe kalite kaybına ve bozulmaya neden olur. Diğer yandan lipolitik aktivitenin olması bazı gıdalarda tat ve aroma oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Örneğin peynir ve sucuk gibi fermente ürünlerin olgunlaşarak istenen tat ve aromaya sahip olması sağlanır. Bir diğer değiş ile belirli bir lipoliz gerçekleşmesi bir kalite faktörü olarak değerlendirilir [45].

Antibiyotikler, hayvanları hastalıklardan korumak ve verimi arttırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak her madde gibi antibiyotiklerin de bir takım avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Önemli olan bunların yerinde kullanımına dikkat edilmesi ve bunda aşırıya kaçılmamasıdır. Çünkü bazı bilinçsiz üreticiler, hastalıkları daha çabuk tedavi edeceklerine ve verimi arttıracaklarına inanarak fazla ve gereksiz antibiyotik kullanımı seçmektedir [48].

Glikopeptide dirençli özellikle vankomisine dirençli *Enterococcus*'ların sayısının artmasıyla birlikte bu türler dünya çapında önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Glikopeptidler immun sistemi zayıf ya da bastırılmış bireylerde birkaç enfeksiyona karşı en son çare olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Enfeksiyona neden olan *Enterococcus* cinsi bakteriler arasında en sık izole edilen türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Meydana gelen enfeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *E. faecalis*'den daha dirençli olmasıyla dikkat çekmekte ve patojenik *E. faecium*'un çok çabuk antibiyotik direnç mekanizması geliştirebilmesinin ve bu özelliğini transfer edebilme kabiliyetinin sağlık açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir [49].

2.3. *Enterococcus*'ların Genel Özellikleri

Enterococcus spp., taksonomide 1984 yılından önce *Streptococcus* cinsi altında yer almaktaydı. 1989'dan sonra Thiercelin tarafından bu cinsin ilk tanımlaması yapılmış ve 1993 yılında Thiercelin ve Jouhaud tarafından *Enterococcus* olarak tanımlanmıştır. Daha önce *S. faecalis* ve *S. faecium* olarak bilinen bakteriler, yeni sınıflandırmada *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak adlandırılmıştır. *Enterococcus* cinsine ait bakteriler, aerobik ya da fakültatif anaerobik, katalaz (-), kok şeklindedirler. Besin gereksinimleri komplekstir.

Gelişebilmeleri için gerek B vitaminleri ve gerekse bazı temel amino asitler açısından pek çok gram (+) bakteriden daha fazla besin maddesine gereksinim duyarlar.

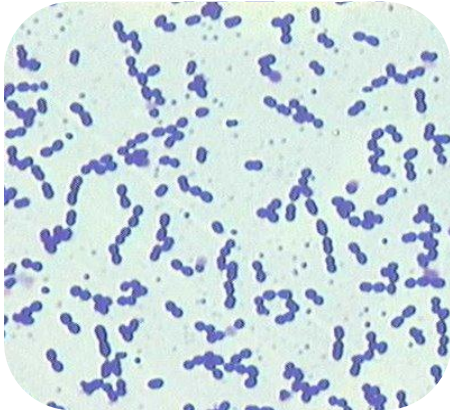
Bu bakteriler Lancefield D grubu içinde yer almaktadırlar. Laktozu fermente edebilirler, arabinoz pozitif ve pürivat negatiftirler. Karbonhidratları fermente ederek L (+) laktik asit oluştururlar ve bu özelliklerinden dolayı tipik homofermentatif laktik asit bakterileri olarak bilinirler, ancak gaz oluşturmazlar. Karbonhidrat metabolizmaları için Embden-Mayerof-Parnas yolunu kullanırlar [49, 50].

İdeal üreme ısısı 35°C'dir. %6,5 NaCl'de ürerler. %40 safra varlığında eskülini hidrolize ederler.

Tüm *Streptococcus bovis* türlerinin ve viridans streptokokların %10'unun safra-eskülin hidrolizi pozitifdir. *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında tüm *Enterococcus* 'lar, PYR (L-pyridonyl-betanaphthylamide) pozitifdir.

Tüm suşlar lösinaminopeptidaz (LAP) oluştururlar. Glikozdan gaz oluşturmazlar ve glikoz fermentasyonunun son ürünü laktik asittir. 60°C'ye 30 dakika dayanıklıdır. Kanlı agarda 0,5-1,5 mm boyutunda, (*Streptococcus*'lardan daha büyük) kabarıklık, gri-beyaz renkte koloniler yaparlar.

Bazen zayıf bir alfa hemoliz meydana getirebilirlerse de genellikle nonhemolitiktirler. *E. faecalis* ve *E. durans* suşları kanlı agarda beta-hemoliz yapabilirler. *E. faecalis*'in bazı suşları at veya tavşan kanı içeren besiyerlerinde beta hemoliz yapmalarına rağmen, koyun kanı içeren besiyerlerinde hemoliz yapmazlar [51, 52, 53].



Resim 2.1. *Enterococcus*'un mikroskopik görüntüsü



Resim 2.2. *Enterococcus* 'un Slanetz-Bartley besiyerindeki görüntüsü

Enterococcus 'ların diğer gram pozitif koklara benzer hücre duvar yapısı vardır. Hücre duvarları peptidoglikan, teikoik asit, lipoproteinler ve yüzey protein antijenlerinden oluşur. Lancefield' in grup D antijeni, hücre duvarı ile bağlantılı bir gliserol olan teikoik asitten oluşur. *Enterococcus* 'lar %80 oranında D grubu antiserumlarla aglütinasyon verirler.

Grup D antijeni tespiti, *Enterococcus*'lar dışında, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. suis*, *Pediococcus* spp.ve *Leuconostoc* spp. gibi diğer gram pozitif bakterilerde de bulunabildiğinden, *Enterococcus*'ların özellikle doğal olarak glikopeptid direnci bulunan *Leuconostoc* spp. ve *Pediococcus* spp.'den ayırımı için PYR hidrolizinden yararlanılır [52].

Grup D streptokoklar, *Enterococcus*'lar ve *Listeria* türleri %40 safra varlığında ürer ve eskülini eskületine hidrolize eder. Eskületin ferrik sitratla birleşir ve siyah bir kompleks oluşur. Viridans streptokok türlerinin çoğu eskülini hidrolize eder, fakat %40 safra varlığında üreyemez. Bu özellik *Enterococcus*'ların diğer *Streptococcus*'lardan ayırt edilmesini sağlasa da inokulum yoğun olursa ve safra konsantrasyonu %40'tan düşük olursa viridans *Streptococcus*'larda da yalancı pozitiflik gözlenebilir. *Lactococcus garvie* PYR ve NaCl pozitif olup, sadece grup D antijeni içermemesi ile *Enterococcus*'lardan ayrılır [52].

Enterococcus'ların laboratuvar ortamında üretilmesi ve yaşatılması kolaydır. Çoğu 60°C'de 30 dk. ısıtmaya dayanıklıdır. Buzdolabında aylarca, -70°C'de yıllarca saklanabilir, fakat donma ve sonra yeniden eritme işlemleri ömürlerini kısaltır.

Normal etüv ortamında, her türlü besiyerinde kolayca ürer. Triptik soy agar, Brain-Heart infüzyon broth, %5 koyun kanlı agar ya da herhangi bir kanlı besiyeri üremesini destekleyicidir. İzolasyonlarında seçici besiyerleri kullanılabilir. Azide içeren besiyerleri seçici izolasyonda başarılıdır [52]. Slanetz Bartley besiyeri *Enterococcus*'lar için seçici besiyeridir [54].

2.3.1. Bazı *Enterococcus* türlerinin özellikleri

E. faecalis: Gastrointestinal flora üyesidir. İnsan kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan türdür. Ayrıca çeşitli hayvanlarda da bulunur. Üriner enfeksiyon, yara, periton sıvısı, derin pelvik apse, endokardit ve kan kültürlerinden izole edilmiştir. Beta hemolitikdir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer [52].

E. faecium: İnsan ve sığırların gastrointestinal sisteminde bulunur. Yiyecek, sebze ve yemlerden de izole edilmiştir. *E. faecalis*'e göre antimikrobiyallere daha dirençlidir. Alfa hemolitikdir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer [52].

E. durans: Süt ve kuru gıdadan izole edilmiştir. İnsan ve hayvanda nadiren, barsak ve üriner sistemden izole edilmiştir. Alfa hemolitiktir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. 50°C'de üremez [52].

E. avium: Kuş, tavuk, köpek gibi hayvanlardan izole edilmiştir. İnsan gastrointestinal sistem florasının da bir parçasıdır. Apandisit, otit ve beyin apselerinden izole edilmiştir. Alfa hemolitiktir. %6,5'luk NaCl'de üremesi zayıftır. H₂S üretir, pigment yapmaz [52].

E. casseliflavus: Bitki ve toprakta bulunur. Vankomisine dirençlidir. Fırsatçı insan enfeksiyonları yapar. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. Hareketlidir, sarı pigment yapar [52].

E. gallinarum: Evcil kuşların gastrointestinal sisteminde bulunur. Koyun kanlı agarda nonhemolitiktir. At kanlı agarda beta hemoliz yapabilir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. Hareketlidir, pigment yapmaz [52].

E. hirae: Domuz ve tavuklarda bulunur. Önceden atipik *E. faecium* sanılırdı. Hemoliz yapmaz. 10-45°C arasında üreyebilir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer [52].

2.3.2. *Enterococcus* türlerinin epidemiyolojisi

Enterococcus'lar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar, böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunur [55]. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. *E. faecalis*, diğer *Enterococcus* türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunur. *Enterococcus*'larda çevre koşullarına dayanıklı olduklarından her çeşit ortamda canlılıklarını sürdürebilirler[56].

Hastane ortamında bulunan stetoskop, kapı tokmağı, yatak, komodin gibi cansız eşyalar üzerinde uzun süre yaşayabilmektedir [52].

Enterococcus'lar bağırsakta kolonize olan gram pozitif koklar arasında en yoğun olanıdır. Bu bölgede en sık *E. faecalis* izole edilir. *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* ve *E. gallinarum* gibi diğer türler insan gastrointestinal kanalında dadeğişik oranda bulunabilirler [57].

Ayrıca yapılan birçok araştırmada gıdalarda en fazla izole edilen *Enterococcus* cinsine ait olan türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* daha az sıklıkla bulunmaktadır [58].

Enterococcus'lar fırsatçı patojen oldukları için insanlarda enfeksiyona yol açan her bir türün insidansı insan gastrointestinal sistemdeki varlığının bir yansıması olacaktır.

Bu bölge hastalıklara neden olan suşların önemli bir kaynağı olarak kabul edilir. Bakteriler enfeksiyon yapmak üzere bulundukları yerden başka bir bölgeye göç edebilir, ayrıca başka konaklara ya da çevreye yayılabilirler.

Ayrıca *Enterococcus* türleri değişik hayvan türlerinde bulunabilirlerse de başka kaynaklarda farklı *Enterococcus* türlerinin bulunması, dağılımın insanlardan daha farklı olduğunu göstermektedir.

Enterococcus'ların dışkıda yoğun olarak bulunmaları, kimyasal ve fiziksel koşullara dayanıklılıkları ile bulundukları ortamda canlılıklarını sürdürmeleri nedeniyle gıda, süt ve kullanım suyunun hijyenik özelliklerini belirlemede ve dışkı kontaminasyonunun saptanmasında bir belirteç olarak kullanılmasına yol açar [59].

Schlegelová ve ark. (2010), yapmış oldukları bir çalışmada, et işleme tesisleri ve süt ürünlerinde sıklıkla kontaminasyona neden olan türleri; *E. coli*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus* olarak belirtmişlerdir [60].

2.4. *Enterococcus*' ların Gıda Ürünleriyle İlişkisi

Enterococcus cinsine ait bakteriler, genelde fekal çevrelerde yoğun olarak bulunmalarına karşın, gıdalarda üretim aşamalarında hijyenik olmayan koşullar sonucunda ortaya çıkarlar [61, 62]. Ayrıca intestinal ve çevresel kontaminasyonla da süt ve et gibi çiğ gıdalarda kolonize olabilirler. Sıcaklık, pH ve tuza karşı olan dirençleri sayesinde, gıda üretimi sırasında canlı kalarak son ürünü de kontamine edebilirler.

Bu sebeple gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir [50, 63]. Bu özelliklerinden dolayı *Enterococcus*'lar sularda ve bazı gıda ürünlerinde hijyen indikatörü olarak kullanılmaktadır [50, 64].

Giraffa ve ark. (1997), İtalya’da yapmış oldukları bir araştırmada gıda ürünlerinde *Enterococcus*’ların varlığı üretim ve yapım sırasındaki yetersiz sanitasyon koşullarının bir göstergesi olduğunu tespit etmişlerdir [65].

Enterococcus cinsi bakteriler, gıdaların normal floralarının da bir parçası oldukları için, sadece kötü hijyen koşullarının göstergesi değildirler [50, 66]. Bu bakteriler birçok gıdada doğal olarak bulunan ve çeşitli gıdaların fermentasyonunda rol oynayan önemli mikroorganizmalardır [50,67]. Özellikle bazı fermente et ürünlerinin ve bazı peynir çeşitlerinin mikrofloralarının önemli bir kısmını oluştururlar [50,62].

Diğer yandan, *Enterococcus* cinsi bakterilerin bazıları, et ürünlerinde, şarap ve meyve sularında bozulma yaparlar [50,68].

Bu organizmalar, sıcaklığa karşı dirençleri sayesinde, pastörizasyonda canlılıklarını koruyabildikleri için pişmiş, dilimlenmiş ya da paketlenmiş etlerde çapraz kontaminasyon sonucunda gelişerek, diğer birçok laktik asit bakterileri gibi bozulma yapan mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar. Fermente sucuklarda da yüksek sayılarda bulundukları zaman bozulmaya neden olurlar [50, 69].

Enterococcus’lar spor oluşturmeyen bakteriler arasında ısıya toleransı en fazla olan bakterilerdendir. Bundan dolayı pişmiş ve işlenmiş etlerde bozulmaya neden olabilirler [69].

Barakat ve ark. (2000), ticari olarak üretilip, modifiye atmosferle paketlenmiş tavuk etlerinin 35 °C’de, 7 gün süreyle depolanması sırasında oluşan baskınmikrofloranın *Lactococcus* spp. ve *Carnobacterium* spp. ile birlikte *Enterococcusfaecalis* olduğunu tespit etmişlerdir [70].

Robredo ve ark. (2000), İspanya’da 18 farklı süpermarketten toplanan 101 tavuk, kaynatılmış jambon ve hindi örneğinden yapılan izolasyonda 92 örnekte 25’inde (%27,2) *Enterococcus* varlığı tespit etmişlerdi [71].

Giraffa (2003), yaptığı çalışmada, *E. faecim*’un 68 °C’de 30 dakikalık ısıtma işlem sonunda canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. Bu nedenle fermente olan ya da olmayan gıdalardaki *Enterococcus* varlığının kaçınılmaz olduğunu ifade etmiştir [62].

Papamanoli ve ark. (2003), fermente sucuklardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin %4'ünün *Enterococcus* spp.'nin oluşturduğunu saptamışlardır [72].

Son yıllarda gıda kaynaklı hastalıkların mikrobiyal kontaminasyondan kaynaklanması nedeniyle patojenleri inhibe eden maddelere karşı ilgi artmaktadır. *Enterococcus*'lar süt ürünlerinden, fermente sosislerden, balıktan, sebzelerden ve fermente yağlardan izole edilebilmektedir [73,74].

İnat (2008), pastırma üretimi sırasında kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve iyileştirme koşullarının araştırılması amacıyla yaptığı çalışmada, farklı zamanlarda üretilen 40 adet pastırma, üretim prosesi boyunca (20 adet deneysel üretim ve özel bir şirkette ticari olarak üretilen 20 adet pastırma) mikrobiyolojik ve kimyasal olarak analiz edildi [75].

Bu amaçla, üretim prosesinin farklı aşamalarında (salamura sonrası, yıkama, baskılama, çemenleme ve kurutma işlemi) et, toz kırmızı biber, salamurada kullanılan tuz, ekipmanlar (bıçaklar, parçalama kütükleri ve baskı makinesi) ve işçi ellerinden toplam 240 adet örnek alındı.

Alınan bu örnekler aerob genel canlı, laktobasil, mikrokok/stafilokok, koagülaz pozitif stafilokok, enterobakter, koliform bakteri sayısı, *B. cereus*, *Enterococcus*, *Pseudomonacae* spp., maya/küf ve sülfid indirgeyen anaerob bakteriler yönünden analiz edildi.

Analiz bulguları; yıkama, baskılama ve çemenleme işlemleri sonrasında aerob genel canlı sayısının, çemenleme işlemi sonrası laktobasil, enterobakter, *Enterococcus*, mikrokok/stafilokok ve maya/küf sayılarının, baskılama işlemi sonrası ise koliform bakteri sayısı ve *Pseudomonacae* spp. sayılarının yükseldiğini göstermiştir.

Elde edilen veriler pastırma üretiminde baskılama ve çemenleme işlemlerinin önemli bir kontaminasyon kaynağı oluşturduğunu, işçi elleri ve parçalama kütüklerinin de diğer kontaminasyon kaynaklarını oluşturduğunu göstermektedir [75].

Ogier ve ark. (2008), yapmış oldukları bir çalışmada, süt örneklerinin, hayvanlarının feçesleri ya da direk su kaynakları ile *Enterococcus* kontaminasyonuna neden olabileceğini belirtmişlerdir [76].

Gıdalara uygulanan işlem sırasında hijyen kurallarına yeterince riayet etmeyen personelin yanı sıra alet ve ekipmanlar mikroorganizmalarca gıdaların kontamine olmasına aracılık etmektedirler [77].

Korenova ve ark. (2009), Slovakya’da yapmış oldukları bir çalışmada, koyun sütü ve et ürünlerinde yüksek oranda kontaminasyona neden olan *Staphylococcus* ve *Enterococcus* bakterilerini tanımlamışlardır [78].

Kinley ve ark. (2010), yapmış oldukları bir çalışmada, işlenmiş hayvan ürünlerinde *Salmonella* ve *Enterococcus* varlığı araştırılarak, *Enterococcus* varlığı %81,3 oranında tespit edilmiş ve *Enterococcus* ’unkontaminasyona sebep olduğunu belirtmişlerdir [79].

Çıtak ve ark.(2010), yapmış oldukları bir çalışmada, dondurulmuş gıdalarda indikatör mikroorganizmaların varlığı ve bu indikatörün gıdada belirli bir limitin üstünde bulunması, ürünlerin yetersiz hijyen ve sanitasyon koşullarında işlendiğini, insan, hayvan, toprak, su ve dışkı kaynaklı bir bulaşma ile birlikte toksijenik mikroorganizmalarla kontamine olabilecek koşullarda üretilip tüketime sunulduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [73].

Tartura ve Lorenzelli 1994 yılında kümes hayvanlarıyla yaptıkları çalışmada izole edilen 93 *Enterococcus* izolatından 64’ünü (%69) *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak tanımlanmıştır [80].

Devriese ve ark. (1995), hayvan kaynaklı (et ve peynir) taze ve hazır gıda örneklerinde yaptıkları çalışmada izole ettikleri 161 türün hepsinin *Enterococcus* cinsine ait olduğunu saptamışlardır. Bunlardan 94’ünü (%58,3) *E. faecalis*, 71’ini (%44,1) *E. faecium* ve 15’ini (%9,3) *E. hirae* olarak tanımlanmışlardır [81].

Wegener ve ark. (1997), *Enterococcus*’ların et ürünlerine bulaşmasının kesim sırasında olduğunu belirterek, yapılan bir çalışmada farklı kesimhanelerden domuz karkasları üzerindeki *Enterococcus* sayısının 10^4 - 10^8 /100 cm³ olduğunu bildirmişlerdir. Bunlar arasındaki dominant mikroflorayı ise *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*’in oluşturduğunu belirtmişlerdir [82].

Hayvanların gastrointestinal sisteminde *Enterococcus* 'ların bulunması kesimhanelerde ete bulaşma potansiyelini arttırmaktadır. Tavuk çiftliklerinde *E. faecalis* izole edilen Gram pozitif türleri içinde ilk sırayı almaktadır [69].

Pavia ve ark., 2000 yılında İtalya'da çiğ etlerden yapmış oldukları çalışmada tavuk, kuzu, domuz, hindi ve dana eti olmak üzere toplam 100 tane et örneğinde (%65,3 tavuk eti, %7 kuzu eti, %31,3 hindi eti, %40 dana eti) *Enterococcus* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Bu et örneklerinden izole edilen toplam 45 *Enterococcus* izolatının 10'u (%24,4) *E. faecium*, 15'i (%33,3) *E. faecalis*, 3'ü (%6,7) *E. durans*, 3'ü (%6,7) *E. gallinarum*, 2'si (%4,4) *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır [83].

Giraffa ve ark. (2002), yapmış oldukları çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri ile yapılan birçok araştırmada gıdalarda en fazla izole edilen mikroorganizmaların bu türler olduğunu belirtmişlerdir. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* daha az sıklıkta izole edilmiştir [66].

Hayes ve ark., (2003), yapmış oldukları çalışmada toplam 981 tavuk, hindi, domuz ve sığır örneklerinden 1357 *Enterococcus* izolatı elde etmişler ve baskın tür olarak %61 oranında *E. faecium* izole etmişlerdir. Bunu %29 oranında *E. faecalis*, %5,7 oranında *E. hirae* izlemektedir [84].

Bodil (2003) ve Klein (2003), yapmış oldukları bir çalışmada, *Enterococcus* 'ların birçok gıdada, özellikle de hayvansal orijinli gıdalarda bulunduğunu ve *E. faecium* 'ungıdalardan sıklıkla izole edildiğini bildirmişlerdir [44,85].

Peters ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada sıklıkla *E. faecalis* ve *E. faecium* ardından ise *E. durans*, *E. hirae* ve *E. avium* izole etmiştir [86].

2003 yılında Malezya'da yapılan çalışmada 150 dondurulmuş et ve et ürünlerinin 39'unda (%26) *E. faecalis* SBV'den ön zenginleştirme metoduyla izole edilmiştir [87].

Sustackova ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada, et ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının %67'sini *E. faecalis*, %13,7'sini *E. faecium* olarak tespit etmişlerdir [88].

E. faecium ve *E. faecalis* gıdalardan ve bağırsaklardan en sık izole edilen, gıda proseslerinde yer alan en önemli türlerdir. Bu iki tür etlerin, özellikle sucukların fermentasyonu sırasındaki baskın mikroflorayı oluştururlar. Ayrıca süt ürünleri ve peynirlerde de yüksek sayılarda bulunurlar.

Her iki tür de peynir ve fermente süt ürünleri ile sucuk, salam gibi fermente gıdaların üretiminde, organoleptik özellikleri geliştiren, raf ömrünü ve stabilitesini arttıran doğal starter kültürlerdir. Ayrıca, *E. faecium* ve *E. faecalis* karışık kültür ya da yardımcı kültürler olarak da kullanılırlar [50].

Karataş (2005), yapmış olduğu çalışmada Adana'daki çeşitli marketlerden toplanan 20 adet sucuk ve 30 adet peynir örneğinden *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium* izole etmiştir [50].

Çıtak ve ark. (2005), çiğ süt ve beyaz peynir ile yapmış oldukları çalışmada, %62,6 *E. faecalis*, %30,1 *E. faecium*, %7,14 *E. durans* izolasyonu yapmışlardır [89].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada, çiğ süttten izole edilen 177 *Enterococcus* izolatının %54,2'si *E. faecalis*, %29'u *E. faecium*, %6,2'si *E. durans* %5'i *E. hirae/dispar*, %3'ü *E. gallinarum*, %2,2'si *E. mundtii* ve %0,5'i *E. raffinosus* olarak izole etmişlerdir [89].

Martin ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada, sosislerden izole edilen *Enterococcus* türlerinden *E. faecium*'u sıklıkla izole etmiştir [90].

Moreno ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada peynir, balık, sosis, dana kıyma ve domuz etinde çoğunlukla *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerini izole etmişlerdir [91].

E. faecalis ve *E. faecium* türlerinin yapılan birçok araştırmada gıdalarda en fazla sıklıkta izole edilen mikroorganizmalar olduğu belirtilmiştir. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* daha az sıklıkta bulunmaktadır [66, 92].

Gomes ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmada, et, süt ve sebzeden en fazla izole edilen *Enterococcus* türünün *E. faecium*, bunu takiben *E. faecalis*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* olduğunu saptamışlardır [93].

Valenzuela ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada, hayvansal gıdalardan izole edilen 25 *Enterococcus* izolatının 16'sı *E. faecium*, 9'u *E. faecalis* olarak bulmuşlardır [94].

Barbosa ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada, fermente etlerden izole edilen 182 *Enterococcus* izolatının 76'sı *E. faecalis*, 44'ü *E. faecium*, 1'i *E. casseliflavus* ve 31'i *Enterococcus* spp. olarak tespit edilmiştir [51].

Fontana ve ark. (2009), Arjantin'de fermente sosislerle yapmış oldukları çalışmada, en fazla sıklıkta *E. faecium* (%56) ve *E. faecalis* (%17) izolasyonu yaparken, daha az sıklıkla *E. durans*, *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* (%27) izolasyonu yapmışlardır [95].

Quednau ve ark. (1998), tavuk ve domuzdan izole ettikleri 279 *Enterococcus* izolatın %73'ünün bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğunu belirlemişlerdir [96].

2.5. Biyoteknolojik Özellikleri

2.5.1. Proteolitik enzim aktivitesi

Gıdalar üzerinde gelişen bazı mikroorganizmalar proteinleri hidrolize ederek tat ve koku bileşenleri üzerinde olumsuz etkiye neden olabilirler. Psikrotrofik mikroorganizmalardan bazıları kuvvetli proteolitik özellikleri nedeniyle süt, et ve dondurulmuş gıdalar üzerinde istenmeyen değişiklikler olmaktadır. Özellikle depolama süresi boyunca bu mikroorganizmalar çoğalmakta ve bazen gıdaları tüketemeyecek hale getirmektedir.

Diğer yandan peynir, fermente et gibi bazı gıdaların olgunlaşması ve yapıların istenen düzeyde gelişmesi mikrobiyel proteolitik aktivitenin bir sonucudur. Ancak süt, et, kanatlı et ve deniz ürünlerinde proteolitik bakteri sayımları kalite kayıplarının belirlenmesinde önemli bir mikrobiyel kriterdir [72, 97, 98, 99].

Enterococcus faecium'un fermente et ürünlerindeki rolleri ve sucuklardaki biyokimyasal aktiviteleri ilgili bazı araştırmalarda, *Enterococcus faecium*'un sucuk aromasına glikolitik, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile katkıda bulundukları ifade edilmiştir [63].

Proteolitik mikroorganizma türleri *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* ve *Proteus* cinsleridir. Bu bakterilerden başka bazı maya ve küf türleri de proteolitik aktivite gösterebilmektedir.

Enterococcus faecalis ve *Micrococcus caseolyticus* gibi proteolitik aktivitenin yanında asit fermentasyonda yapabilenlere asit-proteolitik mikroorganizma denir [72, 97, 100].

Valenzuela ve ark. (2009), yapmış olduğu çalışmada, *Enterococcus*'ların gıdalarda daha çok fermente ürünlerde bulunduğu, bunun nedeni olarak da *Enterococcus*'ların proteolitik, lipolitik ve sitrat aktiviteleri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *E. faecalis* ve *E. faecium*'un ürettiği enterosin gıdalarda bozulmaya neden olan *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilerinin varlığını inhibe ettiği belirtilmiştir [94].

Veljovic ve ark. (2009), *Enterococcus* izolatlarının bakteriyosin ve proteolitik aktivitesi süt ve fermente et ürünlerinin teknolojik özellikleriyle ilgili olabileceğini belirtmişlerdir [101].

Terzic-Vidojevic ve ark. (2009), Azerbaycan'da süt ürünleri ile yapılan bir çalışmada, izole edilen 378 izolatın 296'sı gram pozitif ve katalaz negatif olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paraplantarum* ve *Enterococcus faecium* dominant tür olarak tespit edilmiştir [102].

Terzic-Vidojevic ve ark. (2009), geleneksel peynirlerinde yaptıkları bir çalışmada, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus arizonensis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolasyonu gerçekleştirilirken, *L. plantarum*, *L. arizonensis*, *L. paraplantarum*, *L. farciminis* ve *L. pseudomesenteroides* türleri iyi proteolitik aktivite göstermiştir.

Fermente ürünlerde bakteri çeşitliliğini arttırmak için ve teknolojik olarak kalitesini arttırmak için bu bakterilerin fermente ürünlerde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [102].

Casaburi ve ark. (2008), İtalya'da yapmış oldukları bir çalışmada, fermente etlerde starter kültür olarak *Lactobacillus curvatus* ve *Staphylococcus xylosus* türleri kullanılmasının nedenini, bu bakterilerin lipolitik ve proteolitik özelliklerinden kaynaklandığını belirtmektedir [95].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış oldukları bir çalışmada, çiğ süt ve beyaz peynirden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %91.8'i 7°C'de proteolitik aktivite, %60.7'si 25°C'de proteolitik aktivite, *E. faecium* suşlarının %71'i 7°C'de proteolitik aktivite, %52.6'sı 25°C'de proteolitik aktivite, *E. durans* suşunun %72.2'si 7°C'de proteolitik aktivite, %38.9'u 25°C'de proteolitik aktivitesini pozitif olarak saptanmıştır [89].

Hugas ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada Alman ve İtalyan fermente sucuklarda olgunlaştırma prosesinin sonunda hem starter kültür kullanılan, hem de kullanılmayan sucuklarda *Enterococcus* konsantrasyonunun 103-105 arasında olduğunu bildirmişlerdir. *Enterococcus*'ların sucukların olgunlaştırılması sırasındaki varlığını geniş aralıktaki gelişim sıcaklıkları ve tuza olan yüksek toleransına bağlamışlardır [63].

El-Din ve ark. (2002), çiğ süttten yapılan Mısır Domiatti ve Mish peynirlerinden çeşitli *Enterococcus* türleri izole etmişlerdir.

İzole edilen suşların proteolitik ve lipolitik aktivitelerini incelemek amacıyla peynir üretimi yapmışlar ve peynir üretiminde *Enterococcus faecium* kullanılan örnekleri kontrol örneği ile kıyasladıklarında, bu örneklerin organoleptik özellikleri geliştiren daha fazla suda çözünebilir nitrojen ve toplam serbest amino asit içerdiğini tespit etmişlerdir.

Bu özellikleri nedeniyle *Enterococcus faecium* kültürlerinin geleneksel peynir üretiminde yardımcı kültür olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [104].

Hayaloğlu ve ark. (2001), Mısır'da *Enterococcus faecalis*'in tek veya karışık suşlarının kullanılarak yoğurt benzeri bir ürün elde edildiği ve bu bakterinin yeterince proteolitik aktivite göstererek istenen düzeyde asit ve aroma oluşturduğunu belirtmişlerdir [105].

Arizcun ve ark. (1997), Roncal ve Idıabal peynirlerinden yapmış olduğu çalışmada 4 *E. faecalis*, 2 *E. faecium*, 1 *E. avium* suşlarından proteolitik aktivitenin varlığını tespit etmişlerdir [64].

2.5.2. Lipolitik enzim aktivitesi

Gıda maddelerinin birçoğu lipit içermektedir. Gıdalarda bulunan özellikle düşük molekül ağırlığına sahip serbest yağ asitleri lipit hidrolizinin en önemli nedenlerinden biridir.

Lipit parçalanması genellikle mikrobiyel olmayan nedenlerden kaynaklanmakla birlikte bakterilerin birçoğu mayalar ve bazı küfler sahip oldukları enzimlerle gıdalardaki lipolitik parçalanmaya neden olurlar [97].

Süt, krema, tereyağ, beyaz peynir gibi bazı gıdalarda meydana gelen mikrobiyel lipoliz üründe kalite kaybına ve bozulmaya neden olur. Diğer yandan lipolitik aktivitenin olması bazı gıdalarda tat ve aroma oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Örneğin peynir ve sucuk gibi fermente ürünlerin olgunlaşarak istenen tat ve aromaya sahip olması sağlanır. Bir diğer değiş ile belirli bir lipoliz gerçekleşmesi bir kalite faktörü olarak değerlendirilir [97].

Enterococcus faecium ve *Enterococcus faecalis* bazı gıdalarda organoleptik özellikleri iyileştirmenin yanı sıra lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ile uçucu aromatik bileşikler sentezleme gibi özellikleri nedeniyle bazı fermente süt ve et ürünlerinin olgunlaşması sırasında diğer laktik asit bakterileri ile birlikte starter kültür olarak kullanılmaktadır [106].

Göncüoğlu ve ark (2009), yapmış olduğu çalışmada, *Enterococcus*’ların proteolitik, lipolitik özellikleri ve üreme koşulları göz önünde bulundurularak, starter kültür olarak kullanılmalarının, beyaz peynirin olgunlaşma süresini kısaltabileceği, yüksek sıcaklıkta pastörize edilen süttten üretilen peynirlerde oluşan yapı bozukluklarının çözümlenebileceği düşünülerek planlandığını belirtmişlerdir [107].

Martin ve ark. (2009), yapmış oldukları bir çalışmada, fermente sosislerden sıklıkla *E. faecium* ve *E. faecalis* izolasyonu yapıldığı, *Enterococcus*’un insana geçmesindeki en önemli kaynağın, fermente etlerin çiğ olarak tüketilmesi olarak bildirilmiştir [108].

Siminova ve ark. (2008), yapmış olduğu çalışmada, süt ürünlerinde ve et ürünlerinde izole edilen *Enterococcus*’ların yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu için oluşan üründe kaliteyi arttırdığını belirtmiştir [109].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış olduğu çalışmada, beyaz peynir ve çiğ süttten izole edilen *E. faecalis* suşunun %3.1’i, *E. faecium* suşunun %10.5’i, *E. durans* suşunun %16.7’sinde 30°C’de lipolitik enzim aktivitesini pozitif olarak saptamıştır [89].

Linaje Linaje ve ark. (2004), yapmış olduğu bir çalışmada, *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin peynir ve fermente süt ürünleri ile sucuk, salam gibi fermente gıdaların üretiminde, organoleptik özellikleri geliştiren, raf ömrünü ve stabilitesini arttıran doğal starter kültürler olduğunu bildirmişlerdir [110].

Sarantinopoulos ve ark. (2002), yapmış olduğu bir çalışmada, *Enterococcus*'ların proteolitik ve lipolitik aktiviteleri sayesinde bazı peynirlerin olgunlaştırılmalarında önemli rol oynadığını belirtmişlerdir [111].

Sarantinopoulos ve ark. (2002), yapmış olduğu bir çalışmada, *Enterococcus faecium*, Akdeniz lkelerinde üretilen Feta, Mozerella, La Serena ve Comte gibi peynirlerde doğal floralarının bir parçası olduğunu bildirmiştir [111].

2.6. *Enterococcus* Türlerinin Virülans Faktörleri

Sitolizin: Hemolitik zellik taşımaktadır. Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. İmmun sistem üzerinde makrofaj ve polimorfonükleer lökositlere zarar verici etkisi olduğu ve direkt doku harabiyeti yapabildiği gösterilmiştir. Ayrıca çok sayıda gram pozitif bakteriyi etkileyebilen bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir.

Toksinin insan ile at kanlı agarlarda hemolitik aktiviteye sahipken, koyun eritrositlerinde etkili olmayışı klinik laboratuvarlarda tanısıl açıdan önemli bir özelliktir.

İnsanlarda patojen olan *Enterococcus* suşları arasında, sitolizin üretenlerin oranının, nonpatojen olduğu düşünülen suşlardan fazla olduğu gösterilmiştir.

Sitolizin retimi salgınlardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında %60'a varan sıklıkta saptanabilen bir virülans faktörüdür [52].

Agregasyon Faktörü: Bir yüzey proteinidir. Birçok özelliği ile bakterinin virülansına katkıda bulunmaktadır. Etkin alıcı ve verici hücre birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda bakterilerin agregasyonunu da sağlayarak virülansa katkıda bulunmaktadır.

Agregasyon faktörü, *Enterococcus*'lara kalp kapakları ve böbrek epitel hücrelerine bağlanma ve bu sayede endokardit ve üriner sistem enfeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır.

E. faecalis suşlarına katetere tutunma yeteneğini, agregasyon faktörü sağlamaktadır. Özellikle katater enfeksiyonlarında, *E. faecalis* izolasyonu *E. faecium*'a göre daha fazladır [52].

Hemolizinler: Özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında bulunabilen, tavşan, insan, at, sığır eritrositlerini hemoliz eden hemolizinler virülansta rol oynar. Toksik aktivitesi ile birlikte çok sayıda gram pozitif bakteriyi etkileyebilen bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir. Ayrıca immun sistem üzerinde makrofaj ve polimorfonükleer lökositlere zarar verici etkisi olduğu ve direkt doku harabiyeti yaptığı da gösterilmiştir [52].

Jelatinaz: Jelatinaz enzimi olan ve olmayan izojenik *E. faecalis* suşları ile yapılan çalışmalarda, Jelatinaz üreten suşların akut toksik etkilerinin üretmeyen suşlara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir [52].

Feromonlar: *Enterococcus*'lar tarafından sentezlenen küçük peptitlerdir. Suşlar arası plazmid DNA'sının konjugasyonunu denetler. Nötrofiller için kemotaktik olduklarından enfeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırırılar [52].

Ekstraselüler Süperoksit: *E. faecalis* suşlarının büyük çoğunluğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından sentezlenmektedir. Süperoksit üretiminin bakterinin yaşam süresiniuzattığı gösterilmiştir [52].

Ekstraselüler Yüzey Proteini: İlk kez *E. faecalis* türlerinde tanımlanan büyük yüzey proteininin kompleks bir yaplanması bulunmaktadır. Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlarken, proteinin iç kısmında tekrarlayan ünitelerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandıran bölge bulunmaktadır. Bu proteinin bakterinin immun yanıtı kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir [52].

Lipoteikoik asit: *Enterococcus*'ların D grubu antijenini oluşturur. Tümör nekroz faktör ve interferon salınması neden olarak, immun cevabın düzenlenmesini sağlar [52].

Barbosa ve ark. (2010), Kuzey Portekiz ülkesinde yapmış olduğu bir çalışmada, geleneksel fermente etlerinden (Alheira, Chouriça de Vinhais, Salpicao de Vinhais) *Enterococcus* izolasyonu yaparak, yüksek oranda jelatinaz ve hemolizin virülans özelliği ve genotipik olarak 13 farklı virülans gen tespit etmişlerdir. Buna göre *Enterococcus* türleri, virülans özelliklerinden dolayı gizli patojen tür olabileceğini belirtmişlerdir [112].

Slime oluşumu: İlk kez 1982’de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktörü protein, hekzoaminler, nötral şekerler ve fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır [113,114].

Slime; amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşmaktadır [115].

Slime faktörü mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan sorumludur. Bu yüzeylerde fibrin, fibronektin ve slime faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta ve bu biyofilmden oluşan mikroorganizma çoğu kez sepsise yol açmaktadır [116,117].

Biyofilm Oluşum Mekanizması: Biyofilm (slime) kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek’un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır.

Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978’den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır.

Bu teoriye göre; yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmı biyofilm tabakasını oluşturan matrikste büyürler ve bu sesil bakteriler planktonik eşdeğerlerinden farklılık göstermektedirler [118].

Biyofilmlerin varlığı derin yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır [119].

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz [120].

Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini olusturur.

Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akısı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar.

Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır. Örneğin; *P.aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır [121]. Bu da farklı mikroorganizmaların biyofilm meydana getirme hızının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır:

1. *Mikroorganizmanın yüzeye tutunması*: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fizikselektilesimler bu evrede rol oynamaktadır.
2. *Geri dönüşümsüz tutunma*: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye baslar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Kistik fibrozis olgularında sık görülen *P.aeruginosa* biyofilmlerinde bu materyal aljinat yapıdadır. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterininolumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.
3. *Kolonizasyon*: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.
4. *Kopma*: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm olusturabilir.

Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir [122].

Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir [123,124].

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir. Bunun gibi birtakım çevresel faktörlerin etkisi ile genetik modülasyon sonucu ortaya çıkan ve “quorum sensing” (QS) olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir [125,126].

Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmid transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir [127].

Biyofilmler mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilme yeteneği kazanabilirler [128].

2.7. *Enterococcus*’larda Antimikrobiyal Direnç

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte, 1940’lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli bakteriler bulunduğu; antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da belirtilmektedir [129].

Ancak antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmakta ve bunlarla oluşan infeksiyonların sağaltımında büyük sorunlar yaşanmaya başlamıştır.

Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutu gün geçtikçe büyümektedir [129].

Enterococcus‘lar 1970’li yıllardan beri hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık sebeplerinden biri olarak tanımlanmaktadır. *Enterococcus*‘ların doğal olarak dirençli oldukları üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın kullanımı bu artıştan sorumlu tutulmaktadır. Bu bakterinin hastane ortamında yaşamasının nedenleri yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe intrinsek olarak dirençli olmaları, ayrıca kullanımda bulunan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilme (mutasyon veya plazmid/transpozon aracılığıyla genetik materyalin transfer edilmesi) özelliğine sahip olmalarıdır.

Enterococcus‘lar klinik kullanımda olan antibiyotik gruplarının çoğuna duyarlı ya da dirençlidir. Bu nedenle özellikle ciddi enterokokal enfeksiyonların tedavisi oldukça güçtür ve bakterisidal etki sağlayabilmek için kombinasyon tedavileri yapılmalıdır [130,131].

İntrinsek direnç, *Enterococcus* türlerinin çoğunda ya da tümünde doğal olarak kromozomlarda kodlanmış bir özelliktir.

Bazı antibiyotikler için gözlenen yapısal direnç mekanizmaları tipik olarak bazı *Enterococcus* türlerine veya cinslerine özeldir [59]. Düşük düzeyde klindamisin direnci ve düşük düzeyde aminoglikozid direnci *Enterococcus*‘lardaki intrinsek direncin en tipik örnekleridir. Polimiksine, sefalosporinlere, penisilinaz dirençli semisentetik penisilinlere, aztreonama direnç ve florokinolonlara sınırdan duyarlılık da *Enterococcus*‘ların karakteristik özelliğidir. Penisilinaz dirençli semisentetik penisilinlerin yanı sıra *Enterococcus*‘ların diğer penisilinlere duyarlılığı da azalmıştır [131].

Enterococcus‘lar üzerinde tek başına bakterisidal etkili antibiyotik bulunmaması enterokokal endokardit tedavisinde tek ilaç kullanıldığında başarısızlığa neden olur.

E. faecium beta-laktam grubu antibiyotiklere doğal olarak daha dirençli olmasının yanında aminoglikozid direncinde de türe özgü farklılık gösterir [131].

Kazanılmış direnç, intrensek dirençten daha değişkendir, mevcut DNA'daki mutasyonlarla veya plazmid ya da transpozon üzerindeki bir genetik elemanın kazanımıyla ortaya çıkar [132].

Enterococcus'lardaki yapısal direnç temel olarak iki ana grup içinde antibiyotikte kendini gösterir; aminoglikozidler ve beta laktamlar. Yapısal direnç yüzünden antibiyotiklerin *Enterococcus*'lar üzerinde zayıf etki etmesi nedeniyle endokardite, menenjitte veya özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkan diğer sistemik enfeksiyonlarda tedavide beta laktam gibi hücre duvarına etkili bir ajan veya vankomisin ile birlikte bir aminoglikozid verilir.

Böylece sinerjistik etki ile hücre duvarına etki eden antibiyotik sayesinde aminoglikozid antibiyotiğin hücre içine girmesi kolaylaşır ve yapısal direncin üstesinden gelinerek *Enterococcus*'lara karşı bakterisidal etki sağlanmış olur [59,133].

Enterococcus'lar ayrıca edindikleri değişik genetik özellikler ile kloromfenikol, tetrasiklin, makrolid, linkozamid ve streptograminler, aminoglikozidler, beta laktamlar, glikopeptitler ve son olarak da kinolonlar gibi değişik antibiyotik gruplarına direnç kazanmışlardır.

Enterococcus'larda geçtiğimiz son birkaç dekad içerisinde ortaya çıkan kazanılmış antibiyotik direncinde, özellikle yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta laktamlar ve glikopeptidlere direnç artan oranlarda bildirilmektedir.

Hücre duvarına etkili ajanlara dirençli olan ya da yüksek düzey aminoglikozid direncine sahip izolatlar kombinasyon tedavisinin sinerjistik etkisine direnç gösterecekleri için daha da ciddi problem olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Dolayısıyla bu grup antimikrobiyal ajana karşı direnç durumunun belirlenmesi, antibiyotik kombinasyonları ile sinerji elde edilip edilmeyeceğini göstermesi bakımından tedavi stratejisini belirlemeye yardımcı olacaktır. Bir veya birden fazla aminoglikozide yüksek düzeyli direnç gösteren *Enterococcus* izolatları artan sıklıkla bildirilmektedir [59,134].

Enterococcus türlerinde vankomisin direnci, tedavide bir sorun olarak ilk kez Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde ortaya çıkmış ve bildirilmiştir. Bunu takiben VRE izolasyonu yaygın ve değişik coğrafi bölgelerden sürekli olarak bildirilmiştir.

VRE suşları genotipik ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılır. *Enterococcus*'larda üç tanesi daha sık olmak üzere altı tip glikopeptit direnci saptanmıştır. Bunlar VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG'dir. VanD, VanE, VanG fenotiplerinin epidemiyolojik önemi tam olarak anlaşılamamıştır.

Bilinen fenotipler arasında sadece VanC intrinsek olma özelliğine sahiptir. VanA ve VanB tipi direnç *E. faecium* ve *E. faecalis*'te tanımlanmış olup kazanılmış dirençlerdir [131,135].

Glikopeptide dirençli *Enterococcus*'ların sayısının artmasıyla birlikte bu türler dünya çapında önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır [136].

Glikopeptidler immun sistemi zayıf ya da bastırılmış bireylerde birkaç enfeksiyona karşı en son çare olarak kullanılan antibiyotiklerdir.

Günümüzde *Enterococcus* cinsi bakteriler Amerika'da ikinci en sık hastane enfeksiyonu yapan bakteri olarak bildirilmektedir [44]. *Enterococcus* enfeksiyonlarda klinik izolatların % 85'ini *Enterococcus faecalis*, % 10'unu ise *Enterococcus faecium* oluşturmaktadır [104, 137, 138, 139]. Bu bakteriler klinik uygulamalarda kullanılan bir çok antibiyotiğe karşı dirençlidirler [140].

Meydana gelen enfeksiyonlarda, *Enterococcus faecium*, antibiyotiklere karşı *Enterococcus faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmekte ve patojenik *Enterococcus faecium*'un çok çabuk antibiyotik direnç mekanizması geliştirebilmesinin ve bu özelliğini transfer edebilme kabiliyetinin sağlık açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir [137, 141].

Bunun dışında *Enterococcus* spp.'nin biyogen amin üretimi ile gıda intoksikasyonlarına neden olabilecekleri düşünülmektedir [142,143].

Mikroorganizmalar yalnız bir ilaca karşı değil birçok ilaca karşı direnç kazanabilmektedir. Direnç mekanizması kemoteröpatiklerin mikroorganizmalara olan etki mekanizmalarına karşı oluşturmaktadır.

Enterococcus'ların birçok antimikrobiyal ajana karşı intrinsik dirençli olmaları ve bazı türlerinin bu bakterilere etkili az sayıdaki antibiyotiğe çoklu direnç göstermeleri tedavide güçlüğe neden olmaktadır [144].

Antibiyotiklerin uygunsuz bir şekilde hayvan beslenmesinde gelişim arttırıcı olarak kullanılması, dirençli *Enterococcus* türlerinin ortaya çıkmasında elektif ajan rolü taşımaktadır. Kullanılan bu antibakteriyeller arasında insan tedavisinde de kullanılan antibiyotikler bulunmaktadır [145]. İnsan tedavisinde ve hayvanlarda gelişim arttırıcı olarak kullanılan antibakteriyeller arasında çapraz direnç bulunmaktadır. Çapraz direnç sonucunda hayvan gelişiminde kullanılan antimikrobiyellere direnç, insanlarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlara dirençle sonuçlanmaktadır [146].

1980'li yılların sonunda ilk defa glikopeptidlere karşı dirençli *Enterococcus* (GRE) tespit edilmiş ve bunun neden olduğu enfeksiyon güçlükle tedavi edilebilmiştir [86]. Vankomisin ve teikoplanine karşı direnç, gıda kaynaklı *Enterococcus*'lar arasında en sık izole edilen direnç fenotipidir [66]. *E. faecium* ve *E. faecalis* bu glikopeptidlere karşı direnç kazanmışlardır [147].

Teikoplanin ve vankomisin gibi glikopeptidlerin önemi, çoklu ilaç direnci gösteren türlere ya da penisilin, ampisillin gibi antibiyotiklere karşı alerji gösteren kişilerin klinik tedavisinde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır [66].

Bu antibiyotikler immun sistemi zayıf ya da bastırılmış bireylerde birkaç enfeksiyona karşı en son çare olarak kullanılan antibiyotiklerdir [148]. Bu nedenle vankomisine dirençli *Enterococcus*'lar (VRE) halk sağlığı için global bir tehdit olarak ortaya çıkmaktadır [149].

VRE'ler çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde ve vankomisin ile tedaviye ihtiyaç duyulan hastalarda tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır [140]. Bu nedenle hastanelerde vankomisine dirençli *Enterococcus*'ların ortaya çıkması endişe vermektedir [149].

VRE'lerin ortaya çıkmasıyla *Enterococcus*'lar kullanılan bütün antibiyotiklere karşı direnç kazanmış durumdadırlar [67]. VRE'lerin sebep olduğu enfeksiyonlar, Avrupa ve

Amerika’da önemli bir problem haline gelmiştir [91]. Son yıllarda *E. faecium* en sık ortaya çıkan VRE olarak tanımlanmaktadır [148, 150].

Vankomisine dirençli *E. faecium* (VREF) suşları, hastane ortamları, insanlar, hayvansal kaynaklar, akuatik habitatlar ve tarımsal ürünlerden izole edilmiştir [140].

Yapılan çalışmalar vankomisine yüksek derecede direnç gösteren *E. faecium* suşlarının hayvansal orjinli gıdalarda bulunduğunu göstermiştir[71]. Vankomisine dirençli *E. faecium* suşları lağım suları ile sulanmış bitkiler, atık sular ve dışkıları gibi çeşitli kaynaklardan çevresel kontaminasyon yoluyla gıdalara ulaşabilmektedir [66].

Kesim yerlerindeki kötü hijyen koşulları sonucunda karkaslar fekal kontaminasyonla kontamine olarak hayvansal gıdalar bu dirençli türler için bir vektör olmaktadır [151]. VREF suşları biftek, kümes hayvanları, domuz ve diğer et ürünlerinden izole edilmiştir [146].

Kontamine gıdalar aracılığı ile VRE’lerin insanlara transfer edilebilme riski endişe doğurmaktadır [152].

Direnç genlerinin gıda zinciri aracılığı ile insanları da etkileyebileceği düşünülmektedir [86].

Enterococcus cinsi bakteriler genellikle düşük virulansa sahip olmalarına rağmen, *E. faecium* ve *E. faecalis* kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmaları nedeniyle, klinik terapilerde önemli problemlere neden olmaktadır [85, 93, 153]. Amerika’da sağlıklı bireylerin ortalama %5-20’sinde *Enterococcus* kolonizasyonu ve enfeksiyonu rapor edilmiştir [154].

Pastörize ve çiğ sütlerde antibiyotiğe dirençli *Enterococcus*’ların (ARE) varlığı tespit edilmiştir. ARE’ler et ürünleri, yemeye hazır gıdalar ve hatta probiyotik kültürlerde bulunmaktadır. Bu ürünlerde antibiyotik direnç bulunması, direncin gıda zincirine yayılması riskini doğurmaktadır. Kanamisin ve gentamisine yüksek direnç gösteren *E. faecium* türleri Fransız peynirlerinden ve hastanedeki hastalardan izole edilmiştir [66].

Gıda kaynaklı *Enterococcus*'lar, taşıyıcıya adapte olabilen antimikrobiyel direnç ve virülans özellikler taşıyabilirler [84]. Bu bakteriler, genetik materyallerini değiştirebilmeleri ve genetik bilgilerini diğer türlerle bile paylaşabilmeleri nedeniyle, mevcut genomun değişmesine yol açmakta ya da plazmidler aracılığıyla genetik materyallerin hücreler arası transferine neden olmaktadır [155].

Böylece bu organizmalar kendisi bile virülans faktör taşımazken, zararsız bir türü patojen haline dönüştürebilmektedir [150,156].

Yapılan konjugasyon çalışmaları klinik *Enterococcus* türlerindeki transfer sıklığının, gıda kaynaklı veya probiyotik türlere göre daha başarılı olduğunu göstermiştir [44]. Yapılan araştırmalar klinik örneklerdeki *Enterococcus* türlerinin, gıda kaynaklı türlerden daha fazla virülans faktör taşıdığını ve ayrıca starter kültür olarak kullanılan *Enterococcus* türlerinin, klinik izolatlara göre daha düşük patojeniteye sahip olduklarını göstermektedir [157].

Klinik izolatlardaki virülans faktörlerin etkileri, gıdalardan izole edilen türlerinkinden çok daha fazladır. Gıdalardan izole edilen *E. faecium* suşları genellikle virülans faktör taşımamaktadır. Ancak halen güvenli olarak bilinen bir suşun konjugasyonla bilinen virülans faktörlerden birini kazanma riski vardır. Probiyotik ve starter kültür olarak yüksek sayılarda *Enterococcus* tüketilmesi sonucunda, virülans gen taşıyan plazmidlerin yayılabileceği düşünülmektedir [99]. Çünkü gıdalarda bulunan *E. faecalis* ve *E. faecium*'un antibiyotik direnç taşıyabildikleri tespit edilmiştir [68].

Ayrıca gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan *E. faecium* suşlarının, klinik örneklerden izole edilen medikal orijinli patojenlerden in vitro koşullarda transkonjugasyon yoluyla virülans faktörler elde edilebildikleri tespit edilmiştir [150,156].

Bu nedenle antimikrobiyel dirençli *E. faecium* popülasyonları taşıyan gıdaların tüketimi, muhtemel transferlere aracı olabilir ve taşıyıcıda direnç determinantlarının oluşması ve kolonizasyonu ile sonuçlanabilir [84].

Gousia ve ark. (2010), çiğ ve işlenmiş etlerdeki bakteri kontaminasyonunu ve bu bakterilerin 19 antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençliliğini araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, izole edilen 428 izolatın, 57'si *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır.

Toplam *Enterococcus* izolatının, %42,1'inin antibiyotik dirençliliği yüksek olarak tespit edilmiş ve %21,1'inin vankomisine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir [158].

Riboldi ve ark. (2009), çiğ et, süt ürünleri ve sebzeden izole edilen *E. faecium*, *E. faecalis* ve *Enterococcus* spp.'nin antimikrobiyal direnci araştırılmıştır.

Ampisilin, gentamisin, eritromisin, vankomisin, tetrasiklin, siproflaksasin, streptomisin, norfloksasin, kloromfenikol, basitrasin ve linkomisin antibiyotiklerine dirençli bulmuşlardır [47].

Tuncer ve ark. (2009), yapmış olduğu bir araştırmada, tulum peynirlerinden izole edilen 39 *Enterococcus* izolatının tamamında vankomisine duyarlı olarak tespit etmişlerdir [159].

Avoparsinin büyüme faktörü olarak kanatlı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmasıyla, *Enterococcus*'larda vankomisine karşı çapraz direnç geliştiği ve bu direncin de *S. aureus*'a aktarıldığı bildirilmiştir [160].

Son on yıl boyunca VRE'lerin sayısı artmıştır. Gıda endüstrisinde kullanılacak *Enterococcus* türlerinin seçiminde, türlerin patojenik özellikler ve antibiyotik direnç genleri taşımasına dikkat edilmelidir. Günümüzde modern analiz tekniklerinin gelişmiş olması bu türlerin ve onların özelliklerinin bilinmesinde ve *Enterococcus*'ların bazı gıdalarda kullanımının kabulünde yardımcı olacaktır [44, 63, 66, 106].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış olduğu çalışmada beyaz peynir ve çiğ süttten izole edilen 158 *E. faecalis* suşunun %67'si vankomisin, %58.2'si teikoplanin, %91.1'i eritromisin, %94.9'u okzasilin, %93.7'si streptomisin antibiyotiklerine dirençli olarak saptanırken, izole edilen 76 *E. faecium* suşunun %85.5'i vankomisin, %46'sı teikoplanin, %92.1'i eritromisin, %94.7'u okzasilin, %92.1'i streptomisin antibiyotiklerine dirençli olarak saptamıştır [89].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada çiğ süttten izole edilen 177 *Enterococcus* izolatının antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır.

Bu suşların %42'si ampisilin, %68'i seftriakson, %59'u kloramfenikol, %48'i siproflaksasin, %86'sı eritromisin, %68'i gentamisin, %67'si imipenem, %95'i okzasilin,

%73'ü rifampin, %97'si streptomisin, %44'ü teikoplanin, %45'i tetrasiklin, %37'si vankomisin antibiyotiklerine dirençli olarak saptamıştır [89].

Çıtak ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada izole edilen *Enterococcus* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır.

Bu suşların %86.1'i vankomisin, 66.3'ü teikoplanin, %93'ü eritromisin, %89.1'i streptomisin, %43.5'i gentamisin, %88.1'i okzasilin, %30.6'sı ampisilin, %32.6'sı imipenem, %55.4'ü tetrasiklin, %79.2'si kloroamfenikol, %56.4'ü rifampin antibiyotiklerine dirençli olarak saptamıştır [161].

Erdem ve ark. (2004), hastanede yatan hastalardan izole edilen 17 *E. faecalis* ve 10 *E. faecium* suşunun aminoglikozidlere karşı yüksek derecede dirençli olduğunu tespit etmişlerdir [139].

İtalya'da avoparsin yasağından önce (1997 Mart) ve yasaktan 18 ay sonra (1998 Ekim) olmak üzere iki ayrı dönemde tavuk örneklerin çalışılmış ve van A geni aranmıştır. Bu geni içeren suşlar yasağın uygulanmasından 18 ay sonra yetiştirilen tavuk örneklerinden izole edilen suşlarda %14,6'dan %8'e varan bir düşüş gözlemlenmiştir. İzole edilen türler; *E. faecium*, *E. durans* ve *E. hirae*'dir. En sık rastlanan suş *E. faecium* olup oran %9.3'ten %7'ye düşmüştür [162].

Lukasova ve ark. (2003), sucuk ve çiğ süttten izole edilen *Enterococcus* türlerinin, tetrasiklin, kloromfenikol, gentamisin, eritromisin antibiyotiklerine karşı direnç tespit edildiğini belirterek, bir çalışmada *E. faecium* ve *E. faecalis*'in tetrasiklin direnç genlerini *Lactococcus lactis* sub species *lactis* var *diacetylactis*'in kromozomuna transferinin gösterildiğini bildirmişlerdir.

Yaptıkları çalışmada ise Mısır Dominati peynirlerinden izole ettikleri *E. faecium* suşlarının okzasilin, sephazoline karşı dirençli, ampisillin, amoksisillin ve sefaklor hassas olduğunu tespit etmişlerdir [140].

Cocconcelli ve ark. (2003), model peynir ve fermente sucuk üretiminde klinik kaynaktan alınan *E. faecalis*'in antibiyotik direnç ve virülans genlerini fermentasyon sırasında gıda kaynaklı *E. faecalis*'e transfer edebildiğini göstermişlerdir [163].

Wilson ve ark., çiğ tavuk ve deniz ürünleriyle yapmış oldukları çalışmada 27 çiğ tavuğun 5'inde (%18,5), 151 deniz ürününün 4'ünde (%2,7) vankomisin dirençli *Enterococcus* (VRE) izolatu bulmuşlardır [164].

Giraffa ve ark. (2002), İsveç'te perakende satışa sunulan tavuklardan izole edilen *Enterococcus* türlerinde tetrasiklin, eritromisin ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı direnç tespit edildiğini ve basitrasin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, penisilin, rifampisin, tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençli *Enterococcus* türlerinin dilimlenmiş et, sucuk, biftek, domuz eti ve çiğ etlerden izole edildiğini bildirmiştir [66].

Chen ve ark., tavuk ve klinik örneklerle yaptıkları çalışmada 60 tavuktan 29 vankomisin dirençli *Enterococcus* (VRE), 54 klinik örnekten 31 vankomisin dirençli *Enterococcus* (VRE) izolatu elde etmişlerdir [165].

Robredo ve ark. (2000), 18 farklı süpermarketten alınan 101 tavuk, domuz ve hindi etlerinin yanı sıra 50 kesimhaneden alınan tavuk dışkılarında VRE varlığını araştırmışlardır.

Araştırmada, tavuk örneklerinin % 27.2'sinde, tavuk dışkılarının ise % 16'sından VRE tespit edilmiştir. VRE izolatlarının 11'i *Enterococcus durans*, 10'u *Enterococcus faecalis*, diğer 10'u ise *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır [71].

Gıdalarda, *Enterococcus*'ların glikopeptit direnci oluşumu ve yayılımının, bir glikopeptit olan avoparsin antibiyotiğinin besi hayvanlarında büyüme ve gelişmeyi uyarıcı bir ajan olarak kullanılmasından kaynaklandığı öne sürülmektedir.

Çiftlik hayvanları için özellikle tavuk yemlerinde glikopeptitlerin antimikrobiyal büyüme hızlandırıcı olarak kullanılmasıyla Avrupa'da gıda kaynaklarından, çiftlik hayvanlarından ve çevreden VRE izole edilmesi arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir [82,166], kesimhanelerden ve marketlerden aldıkları et ürünlerinden izole ettikleri *Enterococcus faecium* suşlarında vankomisin direnci tespit etmişlerdir [82]. İsveç'te yapılan başka bir çalışmada da tavuklarda *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. faecalis* türleri izole edilmiş olup en

fazla *E. faecium* da vankomisin dirençliliği %50 oranında tespit edilmiştir. Bu ülkelerde avoparsin kullanımı 1995 yılına kadar devam etmiştir [167].

3. MATERİYAL VE METOD

Araştırmamızda Aralık 2012 - Mayıs 2014 tarihleri arasında Ankara'nın çeşitli marketlerinden temin edilen tatlı su ve deniz balıkları materyal olarak kullanılmıştır. *Enterococcus* türlerinin izolasyonunda, Bergey's of Manuel Systematic Bacteriology (Hardie, 1986) ve Manual of Clinical Microbiology'de (Faclam ve ark., 1995) belirtilen biyokimyasal testler esas alınmıştır. İzole edilen *Enterococcus*'ların bazı virulans özellikleri oluşumu çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları (Kirby-Bauer yöntemiyle) ve bazı biyoteknolojik özellikleri çalışılmıştır.

3.1. Balık Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus*'ların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Yöntemler

3.1.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması

Araştırmamızda Türk Standartları Enstitüsü'nde (TSE) belirtilen esaslara göre balık örnekleri toplanmıştır. Ankara'nın çeşitli marketlerinde satışa sunulan 50 tatlı su ve 50 deniz balığı örneklerin mikrobiyal yükünü etkilemeyecek steril kaplara alınıp laboratuvar'a ortamına getirilerek aynı gün içerisinde çalışılmıştır. 5 gram. balık örneği, 45 mililitre Azid dekstrozo broth besiyerine ilave edilerek blenderda 2 dakika parçalanarak 10^{-1} dilüsyon hazırlanmıştır. Ön zenginleştirme amacı ile 37°C 'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Ön zenginleştirme sonucunda 10^{-1} dilüsyondan 100 μl Slanetz-Bartley besiyerine ekim yapılarak 48-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Gram pozitif kok görünümünde, katalaz testi negatif, pirolidonil aril amidaz (PYR) testi pozitif koloniler konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle incelenmiş ve eskülin hidrolizi pozitif, %6.5 NaCl'li besiyerinde üreyen koloniler *Enterococcus* olarak tanımlanmıştır.

3.1.2. Balık örneklerinden *Enterococcus* izolasyonu

Balık örneklerinden 37°C 'de 48-72 saat inkübasyon sonucunda Slanetz Bartley besiyerinde üreyen tipik kırmızı ve pembe renkteki koloniler koyun kanlı agara pasajlanarak 24-48 saat 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır ve bu kolonilere *Enterococcus* izolasyonu için çeşitli biyokimyasal testler uygulanmıştır.

Yapılan gram boyama ve katalaz testleri sonucunda; Gram pozitif, katalaz negatif özellik gösteren kolonilere 10°C’de ve 45°C’de üreme, % 6,5’luk NaCl’de üreme, eskülin hidrolizi ve PYR testi uygulanmıştır. Gram pozitif, katalaz negatif, 10°C’de ve 45°C’de üreme pozitif, % 6,5’luk NaCl’de üreme pozitif, eskülin hidrolizi pozitif ve PYR testi pozitif olan kolonilere *Enterococcus* ön tanısı konmuştur. Ön tanısı yapılan *Enterococcus* izolatlarının tür seviyesinde adlandırılması için %10’luk karbonhidrat fermentasyon testi (mannitol, sorbitol, sorboz, L-arabinoz, D- raffinoz, sükroz, laktoz), arjinin hidrolizi ve hareket testi uygulanmıştır. *Enterococcus* türlerinin tanımlanmasında Bergey’s of Manuel Systematic Bacteriology (Hardie, 1986) ve Manual of Clinical Microbiology (Faclam ve ark., 1995) belirtilen biyokimyasal testler esas alınmıştır.

3.2. *Enterococcus* İzolasyonu Ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri Ve Testler

3.2.1. Azide dekstroz broth (Oxoid CM 868)

Bileşimi:	g/L
Pepton:	40 g.
Glukoz:	10 g.
Sodyum klorid:	10 g.
Dipotasyum hidrojen fosfat:	5,4 g.
Sodyum azid:	0,4 g.
Distile su:	1000 ml.

pH=6,8±0,2’e ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak 1000 ml distile suda eritilip tüplere 10 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda 121°C’de 15-20 dakika steril edilmiştir.

3.2.2. Peptonlu su (Oxoid CM 9)

Bileşimi:	g/L
Pepton:	10 g.
Sodyum klorid:	5 g.
Distile su :	1000 ml

pH=7,2±0,2'e ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eritilip tüplere 9 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir

3.2.3. Slanetz Bartley besiyeri (LAB 166)

Bileşimi:	g/L
Trypton:	20 g
Maya özütü:	5 g
Glukoz:	2 g
Disodyum fosfat 2H ₂ O:	4 g
Sodyum azid :	0,4 g
Tetrazolium klorid:	0,1 g
Agar :	10 g
Distile su :	1000 ml

pH=7,2±0,2'e ayarlanıp besiyerindeki maddeler otoklavlanmadan bek alevinde iyice eridikten sonra steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

3.2.4. Blood agar base (Oxoid CM 331)

Bileşimi:	g/L
Pepton:	23 g
Nişasta:	1 g
Sodyum klorid:	5 g
Agar :	10 g
Distile su:	1000ml

pH=7,3±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C de 15-20 dakika steril edilmiştir.

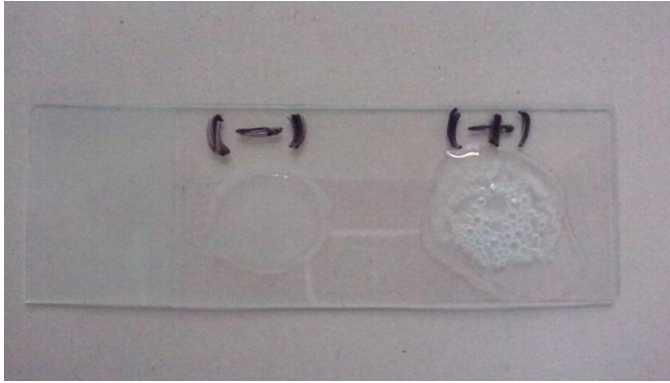
Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup, %5'lik koyun kanı ilave edilerek homojenize olması sağlanarak steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

3.2.5. Gram boyama yöntemi

Klasik gram boyama yöntemi ile boyanarak Gram pozitif, kok ve zincir şeklinde üreme gösteren koloniler çalışılmıştır.

3.2.6. Katalaz testi

Stok kültür üzerinde üreyen koloniler temiz bir lam üzerinde serum fizyolojik içinde süspanse edilerek üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılmıştır. Kabarcıklarının görülmesi halinde test pozitif kabul edilmiştir. Katalaz negatif olan gram pozitif koklar çalışılmaya esas teşkil edecek izolatlar seçilmiştir.



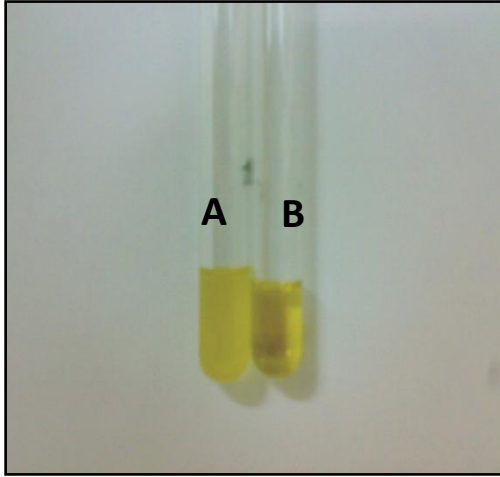
Resim 3.1. Katalaz testi

3.2.7. %6,5 NaCl'li buyyon

Bileşimi:	g/L
Brain heart infusion broth:	37 g
NaCl:	60 g
Distile su:	1000 ml

Besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eritilip tüplere 5 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda $121^{\circ}C$ 'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

%6,5'luk NaCl'lu buyyon içeren tüplere 3-4 koloni inoküle edilerek $37^{\circ}C$ de 24-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda buyyonda bulanıklığın görülmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir.



Resim 3.2. %6,5'luk NaCl'de üreme testi

A: %6,5'luk NaCl'de üreme pozitif

B: %6,5'luk NaCl'de üreme negatif

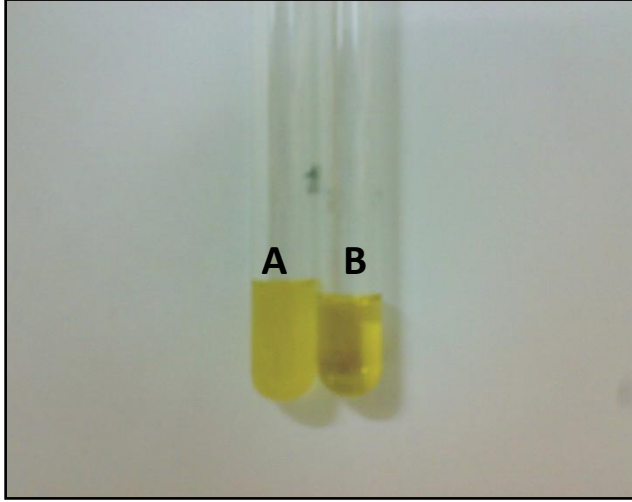
3.2.8. 10°C'de ve 45°C'de üreme

Todd Hewit Broth (LAB M 75)

Bileşimi:	g/L
450 g yağsız kıyma karışımı:	10 g
Trypton:	20 g
Sodyum bikarbonat:	2g
Sodyum klorid:	2 g
Dipotasyum fosfat:	0,4 g
Distile su:	1000 ml

pH=7,8±0,2'e ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eritilip tüplere 5 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

Todd Hewit Broth'a ekilen koloninin 2 ayrı ekimi yapılarak 10°C'de 7 gün, 45°C'de 1 gün inkübe edilmiştir. Bulanıklığın görülmesi durumunda test pozitif olarak kabul edilmiştir.



Resim 3.3. 10°C'de ve 45°C'de üreme testi

A: 10°C'de ve 45°C'de üreme pozitif

B: 10°C'de ve 45°C'de üreme negatif

3.2.9. Eskülin hidrolizi

Eskülin hidrolizasyonu için hazırlanan besiyerine mikroorganizmanın taze kültüründen çizgi ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saatte inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde gözlenen siyah renk pozitif, renksiz üreyenler negatif olarak değerlendirilmiştir.

Eskülin hidrolizi besiyeri

Bileşimi:	g/L
Pepton	10 g
Sodyum sitrat	1 g
Eskulin	1 g
Demir (III) sitrat	0,05 g

pH 7' ye ayarlanıp ortam içeriği 1000 ml distile su içinde çözündürülerek, 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.



Resim 3.4. Eskülin hidrolizi testi (pozitif)

3.2.10. PYR (pyrolidonyl arylamidase) testi (Oxoid ID0580)

PYR agar

Bileşimi:	g/L
Todd-hewit broth:	22g
L-pyrog glutamik asit beta-naphtylamide:	0,1g
Agar:	7g
Distile su:	1000ml

Kimyasal maddeler ısıtılarak eritilmiş ve 121°C’de 15-20 dakika sterilize edildikten sonra 10 ml steril petrilere dağıtılmıştır.

PYR ayıracı

Bileşimi:	g/L
p-dimethylaminocinnamaldehyt:	0,2g
Sodyum dodesil sülfat:	2,5 ml
Glasiyal asetik asit :	2,5ml
2-metoksi etanol:	5ml
Distile su:	90ml

p-dimethylaminocinnamaldehyt diğer maddeler içinde eritilerek +4°C’de saklanmıştır. Bütün izolatlar PYR agara ekimleri yapılarak 35°C’de inkübe edilmiştir. Üreyen

kolonilerin üzerine %2'lik PYR ayıracı damlatılmıştır. Kırmızı ve pembe renk oluştuğunda test pozitif sarı ve turuncu renk oluştuğunda test negatif olarak değerlendirilmiştir.

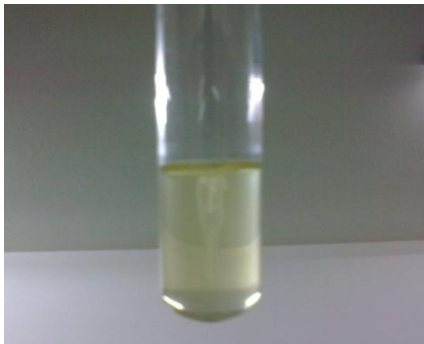
3.2.11. Hareket testi

SIM besiyeri (Oxoid CM:435)

Bileşimi:	g/L
Trypton:	20g
Pepton:	60,1g
Ferroz amonyum sülfat:	0,2 g
Sodyum trisülfat:	0,2 g
Agar:	3,5g

pH=7.3±02 ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak 1000 ml distile suda eritilip tüplere 5 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

Enterococcus kültürlerinden alınan koloniler iğne öze ile besiyerinin dip kısmına kadar dik bir şekilde batırılarak ekilmiştir. 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda ekim çizgisi boyunca ters çam ağacı biçiminde gösteren koloniler hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.5. Hareket testi (Pozitif Sonuç)

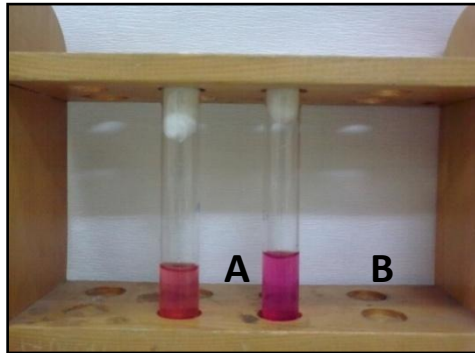
3.2.12. Arjinin hidrolizi

Arjinin dihidroliz besiyeri (Thornley)

Bileşimi:	g/L
Pepton:	1g
NaCl:	5gr
K ₂ HPO ₄ :	0,3 g
Fenol kırmızısı:	0,01g
L-arjinin monohidroklorid:	10 g
Agar:	3g
Distile su:	1000ml

pH=7.2±0.2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak 1000 ml distile suda eritilip tüplere 4 ml pipetlendikten sonra pamuklanarak otoklavda 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

Stok kültürden alınan koloniler besi yerine ekim yapılarak 27°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda besiyerinin rengi portakal kırmızısından mor renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.6. Arjinin hidrolizi testi

A: Arjinin hidrolizi negatif

B: Arjinin hidrolizi pozitif

3.2.13. Karbonhidrat fermentasyon testi

Purple broth base (BD Difco 211558)

Bileşimi:	g/L
Proteaz pepton no:3:	10g
Sıgır özütü :	1g
Sodyum klorid:	5g
Brom krezol moru :	0,02g
Distile su:	1000ml

Besiyeri pH=6.8±0,2'ye ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra tüplere 9 ml pipetlenerek 121°C'de 15-20 dakika steril edilmiştir.

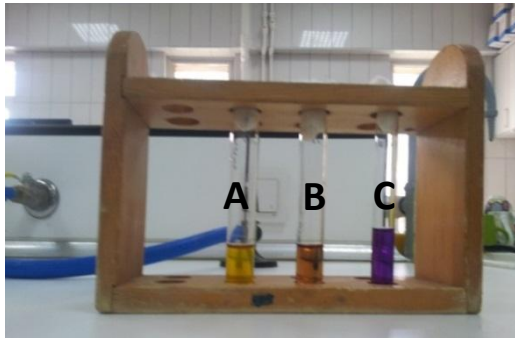
Karbonhidrat solüsyonu

Bileşimi:	g/L
Karbonhidrat (mannitol, sorbitol, sorboz, arabinoz, raffinoz, sukroz):	1 g
Distile su:	10ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Karbonhidrat temel besiyeri: 9 ml

Karbonhidrat solüsyonu: 1 ml



Resim 3.7. Karbonhidrat fermentasyon testi

A: Karbonhidrat fermentasyon testi pozitif sonuç

B: Karbonhidrat fermentasyon testi değişken sonuç

C: Karbonhidrat fermentasyon testi negatif sonuç

Çizelge 3.1. Gram pozitif kok ve kokobasillerin ayırımında kullanılan testler [37]

Cins	VAN	GAZ	PYR	LAP	%6.5 NaCl	10°C'de üreme	45°C'de üreme	Eskülin Hidrolizi
<i>Enterococcus</i>	H-D	-	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus</i>	H	-	+	+	Değ.	-	-	Değ.
<i>Lactococcus</i>	H	-	+	+	Değ.	+	-	+
<i>Aerococcus</i>	H	-	Değ.	Değ.	+	Değ.	-	-
<i>Leuconostoc</i>	D	+	-	Değ.	Değ.	+	Değ.	Değ.
<i>Pediococcus</i>	D	-	-	-	Değ.	-	Değ.	+
<i>Gamella</i>	H	-	Değ.	+	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	H	-	+	+	+	+	-	+

VAN=vankomisin direnci, GAZ=gaz oluşturma, PYR= L-pyridonil-betanaphthylamide, LAP= lösinaminopeptidaz, H=hassas, D=dirençli, (+)=pozitif, (-)=negatif, Değ.=değişken.

3.3. *Enterococcus* Türlerinin Virulans Faktörleri

3.3.1. Jelatin hidroliz testi

Tüplere kültürlerden daldırma ekim yapılmıştır. Tüpler 22 °C' de 3-4 gün inkübasyona bırakılmış ve -4 °C' de soğutulmuştur. Jelatin hidrolizi testinde pozitiflik besiyerinin sıvılaşması ile anlaşılmıştır.

Nutrient jelatin besiyeri (Oxoid CM 135 a)

Bileşimi: g/L
 Lab-Lemco powder: 3 g
 Pepton : 5 g
 Gelatin: 120 g
 pH 6,8 ± 0,1

Ortam içeriği 1000 ml distile su içinde çözündürülür, 121 °C'de 15 dakika steril edilir

3.3.2. DNaz testi

Tanım: Bazı bakteriler deoksiribonükleaz enzimi yaparlar. Bu test bakteride böyle bir enzimatik aktivitenin mevcudiyetinin araştırılmasıdır. Kullanılan besiyerinde DNA vardır. Bakterinin DNaz aktivitesi varsa koloni çevresinde bulunan DNA parçalanacaktır. İnkübasyonu takiben kullanılan ayıraç bir DNA boyasıdır.

Koloni etrafında DNA olup olmadığını ortaya çıkarır. İncelenecek bakterinin saf kültüründen alınarak bu besiyerine ekim yapılır ve inkübasyona bırakılır. Daha sonra koloniler üzerine 1 damla ayıraç damlatılır ve şeffaf zon aranır. Şeffaf zon oluşması pozitifliğin göstergesidir.

Deoksiribonükleaz agar

Bileşimi:	g/L
Deoxyribonucleic acid:	2 g
Phyton:	5 g
Sodium chloride:	5 g
Trypticase:	15 g
Agar:	15 g
pH:	7,3

Ortam içeriği 1000 ml distile su içinde çözündürülür, 121 °C’de 15 dakika steril edilir.

Ayıraç

1N HCl veya % 0.1 Toluidin Mavisi

İncelenen bakteri DNaz pozitif ise koloni etrafında berak ve şeffaf bir zon görülür. Toluidin mavisi kullanılırsa bu saha parlak pembe renk alacaktır. Bu testin sonucunun pozitif olduğunu gösterir.

3.3.3. Hemoliz testi

Bu test bakterinin hemolitik aktivitesinin varlığının tespiti için kullanılır. Kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinin çevresinde eritrositler parçalanarak zon oluşturur.

Eritrositin parçalanması hemolizin enzimi ile olur. Bir öze dolusu bakteri kanlı agara ekilir ve inkübasyona bırakılır. Koloni çevresinde zonlar oluşursa pozitif sonuç, eğer eritrositler parçalanmaz ve zon oluşmazsa negatif sonuç alınır. *Enterococcus* türleri çoğunlukla non-hemolitiklidir.

Blood agar base (Oxoid CM 331)

Bileşimi:	g/L
Pepton:	23 g
Nişasta:	1 g
Sodyum klorid:	5 g
Agar:	10 g
Distile su:	1000ml

pH=7,3±0,2'ye ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C de 15-20 dakika steril edilmiştir. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup, %5'lik koyun kanı ilave edilerek homojenize olması sağlanarak steril plaklara 10'ar ml dağıtılmıştır.

3.3.4. Biyofilm oluşumunun araştırılması

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı metod geliştirilmiştir [168,169]. . Mikroplate testi[170] ve Kongo Kırmızı Agar Testi [169] gibi testlerdir. Bu 2 yöntem uygulanarak balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin biyofilm üretimi araştırılmıştır.

Mikroplate ile biyofilm ölçümü

Christensen ve ark.,(1982) tarafından açıklanan mikroplate testi güvenilirlik açısından en sık kullanılan ve biyofilm oluşumu tespiti için standart test olarak kabul edilen yöntemdir[171].

Biyofilm testi için bakteriyel suşların depolanması

Araştırmada kullanılan *Enterococcus* türlerinin suşları stok kültürden alınarak aktifleştirilmek üzere (TSB) 'a aktarıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası TSA agardan alınan koloniler ile biyofilm çalışması yapılmıştır.

İnokulasyon

İnokulasyondan önce, TSA agardan alınan test edilecek suşlar sıvı ya da katı ortamda kültür edilmiştir. İnkübasyon sonrası seçilen 3-4 özdeş koloni 5 ml'lik TSB de süspanse edilip çalkalanmaksızın 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra durgun faz kültürü vortekslenip, 1/100 oranında dilüsyon yapılmış ve dilüsyonu yapılan solüsyon tekrar vortekslenmiştir.

Biyofilm kültürü

Sıvı besiyerinde gelişen bakteriden hazırlanan kültür sıvı besiyerine (TSB , TSB + %2 Glikoz) 1/100 oranında dilüe edilip , her bir kuyucuğa 200 µl aktarılır. Negatif kontrol kuyucuğu yalnız sıvı besiyeri ile doldurulmuştur. Biyofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin in vitro koşullarda değişmeye oldukça müsait olmasından dolayı hataları minimize etmek ve bilgilerin güvenilirliğini sağlamak için yapılan testler her bir suş için 3 kez tekrarlandı. Bakteri inoküle edilen plateler kapağı kapatılarak uygun koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır[172].

Yıkama

İnkubasyondan sonra kuyucukların içi boşaltılıp her bir kuyucuk üç kez 300 µl' lik steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile nazikçe mikropipet kullanılarak yıkanmıştır. Her yıkama aşamasından sonra fiske vurularak kuyucuklar boşaltılmıştır. Plateler ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır [172].

Fiksasyon

Yıkamadan sonra yüzeye zayıf tutunan bakterilerin kalıntısı 200 µl % 99'luk metanol ile 20 dakika muamele edilmiştir. 20 dakika sonunda mikrolateler boşaltılır ters çevrilerek kurumaya bırakılır [172].

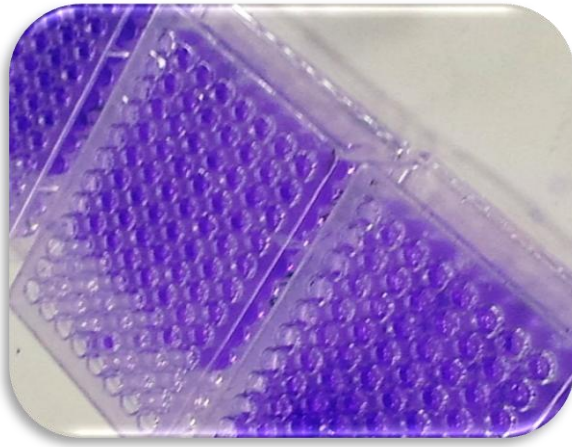
Boyama

Plateler havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 μ l % 1'lik kristal viyole eklenerek 15 dk boyanması için beklendikten sonra içerik boşaltıldı. Daha sonra boyanın fazlası pipetle çekilip geri kalan kısım akan su altına tutularak yıkanmıştır [172].

Boyanın geri çözündürülmesi

Mikroplateler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hücrelere bağlanan boyanın geri çözölmek için her kuyucuktaki boya % 33'lük glasiyel asetik asit ile muamele edilmiştir. Mikroplatelerin havayla temasını önlemek için de kapakları kapatılıp oda sıcaklığında en az 30 dakika çalkalanmaksızın beklenmiştir.

Glasiyel asetik asit eklenmesi kuyucukların hem tavan hem de duvarlarına yapışan bakterilerin indirekt ölçölmesine olanak sağlamaktadır.



Resim 3.8. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücresinin tuttuğu boyanın geri çözödürölmesi

Sonuçların ölçölmesi

Kristal viyole ile boyanan kuyucuklardaki boya glasiyel asetik asit ile çözödüröldükten sonra her bir kuyucuktaki optik yoğunluk (OD) 570 nm'de mikroplate okuyucuda ölçölmüştür.

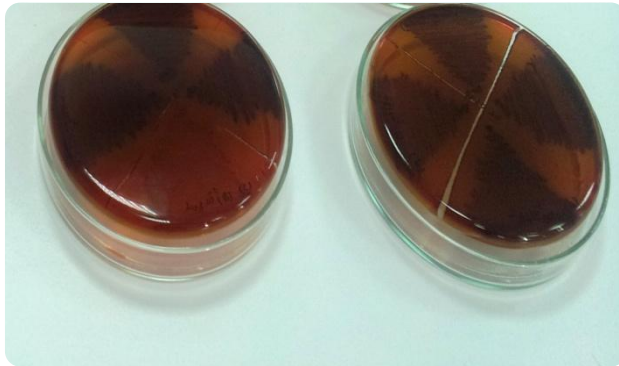
Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle Slime Faktörünün Belirlenmesi

Enterococcus olarak adlandırılan suşlar kongo kırmızılı Agara tek koloni ekimi yapılarak 37°C’de 48-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra parlak siyah koloniler slime (+) olarak değerlendirilmiştir.

Kongo Kırmızılı Agar

Bileşimi:	g/L
Sükroz:	50 g
BHI broth:	37 g
Kongo kırmızısı:	0,8 g
Agar:	10 g
Distile su:	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve plaklara dağıtılır.



Resim 3.9. Kongo kırmızılı agarda slime faktörünün tespit edilmesi

3.4. *Enterococcus* Türlerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testi CLSI’da(Clinical and Laboratory Standarts Instute) [173] belirtilen kriterlere göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi izlenerek yapılmıştır. Kanlı agar besiyerine ekilip 30-35°C’de 24 saat inkübe edilen kültürlerden 2-3 koloni alınarak, 0,5 Macfarland bulanıklık standardına eşdeğer şekilde serum fizyolojik içinde süspanse edilmiştir. Süspansiyondan, steril eküvyon çubuk ile alınarak kanlı besiyeri yüzeyine ekim yapılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir.

37°C’de 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan antibiyotik inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen zon çapları CLSI’da (CLSI, 2009) belirtilen zon çaplarıyla karşılaştırılarak *Enterococcus*’ların, antibiyotiklere hassas ve dirençli olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

Araştırmada ampisilin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), gentamisin (10 µg), eritromisin (15 µg), penisilin (10 µg), teikoplanin (30 µg), vankomisin (30 µg), levofloxacin (5 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve antibiyotik zon çapları Çizelge 3.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. *Enterococcus* Türleri İçin Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Duyarlılık Sınırları

Antibiyotikler	Antibiyotik Konsantrasyonu	Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapı (mm.)	
		Hassas (H)	Dirençli (D)
Ampisilin (AM)	10 µg	≥17	≤16
Siprofloksasin(CIP)	5 µg	≥21	≤15
Vankomisin (VA)	30 µg	≥17	≤14
Teikoplanin (TEC)	30 µg	≥14	≤10
Kloromfenikol (C)	30 µg	≥18	≤12
Eritromisin (E)	15 µg	≥23	≤13
Gentamisin (CN)	10 µg	≥10	≤6
Novobiosin(NV)	30 µg	≥22	≤17
Nitrofurontoin(F)	300 µg	≥17	≤14
Tetrasiklin(TE)	30 µg	≥19	≤14

Mueller Hinton Agar (LabM 39)

Bileşimi:	g/L
Beef infusion solids	2,0gr
Acid hydrolysed casein	17,5gr
Starch	1,5gr
Agar no:	1 17,0
pH: 7,3±0,1	

Antibiyogram testi için kullanılmıştır. 38 gramı 1 litre distile suda çözdürülüp 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Serum fizyolojik

Bileşimi:	g/L
Sodyum klorür:	8,75gr

8,75 gramı 1 litre distile suda çözündürölüp, 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

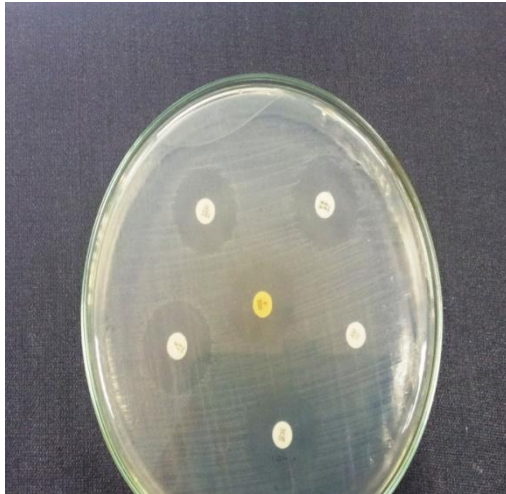
Mc Farland bulanıklık tüpü

0,5 McFarland standardına uygun bulanıklık tüpü hazırlamak için;

0,048 M BaCl ₂ (%1,175 g BaCl ₂ ·2H ₂ O)	0,5ml
+ 0,18 M H ₂ SO ₄ /H ₂ O (%1 v/v)	99,5 ml

0,5 Mc Farland = 10 cfu/ml

Baryum klorür ve sülfirik asit kullanılarak hazırlanan bu solüsyon deney tüplerine 5’er ml ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.



Resim 3.10. *Enterococcus*’larda antibiyotik duyarlılık testi

3.5. *Enterococcus* Türlerinin Biyoteknolojik Özelliklerinin Araştırılması

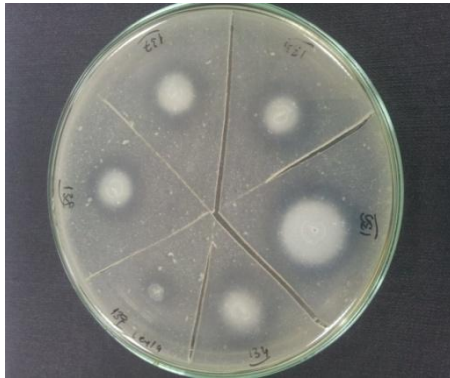
3.5.1. Balıklardan izole edilen *Enterococcus*'ların proteolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Test edilecek izolatdan iğne uçlu öze ile alınan bakteriler skim milk agara (SMA) saplama şeklinde inoküle edilmiştir ve inkübasyonları sonucu besiyerinde şeffaf zon oluşturan türlerin proteolitik aktiviteleri pozitif ve zon oluşturmeyen türler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Skim Milk Agar (SMA)

Bileşimi:	g/L
Skim milk powder	25,0 g
Distile su	250 ml
Agar	5,0 g
Distile su	250 ml

Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Her iki karışım 50°C'ye gelince karıştırılır ve petrilere dökülür.



Resim 3.11. Proteolitik enzim aktivitesi testi (Pozitif Sonuç)

3.5.2. Balıklardan izole edilen *Enterococcus*'ların lipolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Test edilecek izolatdan iğne uçlu öze ile alınan bakteriler tribütrin agara (TA) saplama şeklinde inoküle edilmiştir. Bakterilerden 24 saat 30°C inkübasyon sonucu besiyerinde şeffaf zon oluşturan türlerin lipolitik aktiviteleri pozitif ve zon oluşturmayan türler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tributrin Agar (Merck 1.01957.0500)

Bileşimi:	g/L
Meat pepton	2,5 g
Kazein pepton	2,5
Yeast extract	3,0 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

pH 7,5 $\pm$ 0,2 ayarlanıp besiyerindeki maddeler tartılarak distile suda eridikten sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir Daha sonra besiyeri oda sıcaklığına kadar soğutulur ve hızlıca karıştırılarak üzerine 10ml/1000ml oranında Tributyrin ilave edilir.



Resim 3.12. Lipolitik enzim aktivitesi testi [41].

4. BULGULAR

Araştırmamızda Ankara'nın çeşitli marketlerinden toplanan 100 balık örneği(50 tatlı su, 50 deniz) materyal olarak kullanılmıştır. Bu örneklerden izole edilen *Enterococcus* türleri çeşitli biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır.

Tanımlanan bu izolatların slime, jelatinaz, DNaz ve hemoliz gibi bazı virulans özellikleri ve biyofilm oluşumları incelenmiştir.

Enterococcus türlerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, siprofloksasin, tetrasiklin teikoplanin, nitrofurantoin, vankomisin, gentamisin ve novobiosin antibiyotiklerine dirençlilikleri araştırılmıştır.

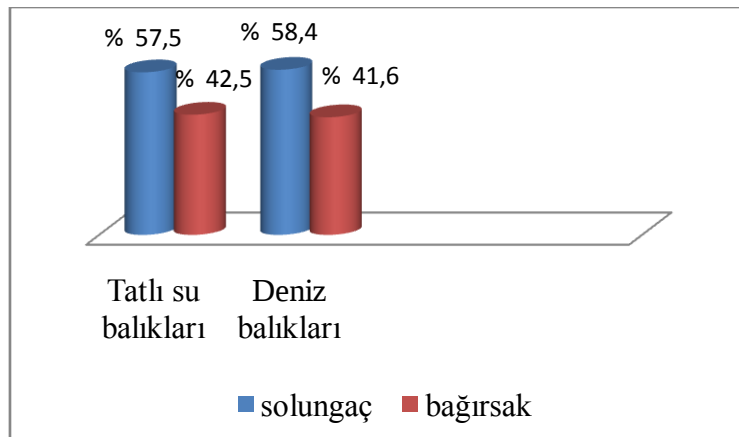
Enterococcus türlerinde 4°C'deki ve 20°C ve 37°C'deki proteolitik enzim aktiviteleri, lipolitik enzim aktiviteleri araştırılmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışılan balık örneklerinin dağılımı

TATLI SU BALIKLARI			DENİZ BALIKLARI		
	n	%		n	%
Sazan	7	14	Palamut	7	14
Alabalık	22	44	Levrek	21	42
Somon	21	42	Çipura	22	44
Toplam	50	100	Toplam	50	100

n=izolat sayısı %'ler toplam izolat sayısı üzerinden hesaplanmıştır

Çizelge 4.2. Bağırsak ve solungaçtan izole edilen tatlı su ve deniz balıklarının dağılımı



Çizelge 4.3. Bağırsak ve solungaçtan izole edilen *Enterococcus* ların dağılımı

<i>Enterococcus</i> türleri	Bağırsak		Solungaç		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus spp.</i>	9	14,3	19	21,8	28	18,7
<i>E.casseliflavus</i>	10	15,9	15	17,2	25	16,7
<i>E.flavescens</i>	7	11,1	14	16,1	21	14
<i>E.gallinarum</i>	12	19,1	8	9,2	20	13,3
<i>E.raffinosis</i>	5	7,9	8	9,2	13	8,7
<i>E.solitarius</i>	5	7,9	7	8,15	12	8
<i>E.pseudoavium</i>	4	6,3	7	8,15	11	7,3
<i>E.avium</i>	4	6,3	2	2,3	6	4
<i>E.faecalis</i>	2	3,2	4	4,6	6	4
<i>E.malodoratus</i>	2	3,2	1	1,1	3	2
<i>E.faecium</i>	–	–	1	1,1	1	0,66
<i>E.hirae</i>	1	1,6	–	–	1	0,66
<i>E.durans</i>	1	1,6	–	–	1	0,66
<i>E.mundtii</i>	–	–	1	1,1	1	0,66
<i>E.dispar</i>	1	1,6	–	–	1	0,66
TOPLAM	63	100	87	100	150	100
n: İzolat sayısı						

Araştırmamızda tatlı su balık çeşitlerinden 7'si(%14) sazan, 22'si(%44) alabalık ve 21'i(%42) somondan olmak üzere *Enterococcus* türleri izole edilmiştir. Deniz balıklarının 7'si(%14) palamut, 21'i(%42) levrek ve 22'si (%44) çipura örneğidir(Çizelge 4.1). Tatlı su ve deniz balıklarının solungaç ve bağırsak örneklerinden *Enterococcus* türleri elde edilmiştir. Çizelge 4.2.'e göre, 100 balık örneğinden 150 *Enterococcus* izolatu elde edilmiştir. 150 *Enterococcus* izolatın, 63'ü (%42) bağırsak örneklerinden, 87'si (%58) solungaç örneklerinden izole edilmiştir

Çizelge 4.4. Tatlı su Balıklarından İzole Edilen *Enterococcus* Türleri

<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Cyprinus carpio</i> (Sazan)		<i>Salmo trutta</i> (Alabalık)		<i>Salmo salar</i> (Somon)	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus spp.</i>	1	25	5	22,7	7	14,9
<i>E.casseliflavus</i>	–	–	5	22,7	9	19,2
<i>E.flavescens</i>	–	–	2	9,1	8	17
<i>E.gallinarum</i>	–	–	4	18,2	4	8,5
<i>E.raffinosis</i>	–	–	2	9,1	–	–
<i>E.solitarius</i>	–	–	3	13,6	3	6,4
<i>E.pseudoavium</i>	–	–	1	4,6	7	14,9
<i>E.avium</i>	1	25	–	–	3	6,4
<i>E.faecalis</i>	–	–	–	–	5	10,6
<i>E.malodoratus</i>	2	50	–	–	1	2,1
TOPLAM	4	100	22	100	47	100
n: İzolat sayısı						

Çizelge 4.5. Deniz Balıklarından İzole Edilen *Enterococcus* Türleri

<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Sarda sarda</i> (Palamut)		<i>Dicentrarchus labrax</i> (Deniz levreği)		<i>Sparus auratus</i> (Çipura)	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus spp.</i>	1	20	8	20,5	6	18,2
<i>E.casseliflavus</i>	–	–	6	15,4	5	15,2
<i>E.flavescens</i>	–	–	5	12,8	6	18,2
<i>E.gallinarum</i>	–	–	7	17,9	5	15,2
<i>E.raffinosis</i>	–	–	8	20,5	3	9,1
<i>E.solitarius</i>	–	–	3	7,7	3	9,1
<i>E.pseudoavium</i>	3	60	–	–	–	–
<i>E.avium</i>	–	–	1	2,6	1	3
<i>E.faecalis</i>	1	20	–	–	–	–
<i>E.faecium</i>	–	–	1	2,6	–	–
<i>E.hirae</i>	–	–	–	–	1	3
<i>E.durans</i>	–	–	–	–	1	3
<i>E.mundtii</i>	–	–	–	–	1	3
<i>E.dispar</i>	–	–	–	–	1	3
TOPLAM	5	100	39	100	33	100

Çizelge 4.8. Balık örneklerinden izole edilen slime (+) ve slime (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

<i>Enterococcus</i> Türleri	Slime Oluşumu			
	Slime (+)		Slime (-)	
	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>E.spp</i> (n=28)	19	67,9	9	32,1
<i>E.casseliflavus</i> (n=25)	16	64	9	36
<i>E.flavescens</i> (n=21)	14	66,7	7	33,3
<i>E.gallinarum</i> (n=20)	14	70	6	30
<i>E.raffinosis</i> (n=13)	8	61,5	5	38,5
<i>E.solitarius</i> (n=12)	8	66,7	4	33,3
<i>E.pseudoavium</i> (n=11)	8	72,7	3	27,3
<i>E.avium</i> (n=6)	4	66,7	2	33,3
<i>E.faecalis</i> (n=6)	6	100	–	–
<i>E.malodoratus</i> (n=3)	3	100	–	–
<i>E.faecium</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.hirae</i> (n=1)	1	100	–	–
<i>E.durans</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.mundtii</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.dispar</i> (n=1)	1	–	–	–
TOPLAM(n=150)	102	68	48	32
n: İzolat sayısı				

Çizelge 4.10.(devam). Deniz balıklarından izole edilen *Enterococcus* türlerinin biyofilm oluşumları

<i>Enterococcus</i> Türleri 37°C'de TSB+%2 Glukoz	<i>Sardasarda</i> (Palamut)				<i>Dicentrarchus labrax</i> (Deniz leğesi)				<i>Spansauratus</i> (Çipura)			
	n(%)				n(%)				n(%)			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
<i>Enterococcus spp</i> (n=15)	-	-	1(6,7)	-	1(6,7)	5(33,3)	2(13,3)	-	4(26,7)	2(13,3)	-	-
<i>E. casseliflavus</i> (n=11)	-	-	-	-	2(18,2)	4(36,4)	-	-	1(9,1)	4(36,4)	-	-
<i>E. flavescens</i> (n=11)	-	-	-	-	2(18,2)	3(27,3)	-	-	4(36,4)	1(9,1)	1(9,1)	-
<i>E. gallinarum</i> (n=12)	-	-	-	-	1(8,3)	6(50)	-	-	4(33,3)	1(8,3)	-	-
<i>E. raffinosus</i> (n=11)	-	-	-	-	-	5(45,4)	3(27,3)	-	3(27,3)	-	-	-
<i>E. solitarius</i> (n=6)	-	-	-	-	2(33,3)	1(16,7)	-	-	1(16,7)	2(33,3)	-	-
<i>E. pseudoavium</i> (n=3)	-	-	2(66,7)	1(33,3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. avium</i> (n=2)	-	-	-	-	-	1(50)	-	-	-	1(50)	-	-
<i>E. faecalis</i> (n=1)	-	-	-	1(100)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (n=1)	-	-	-	-	1(100)	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(100)	-	-
<i>E. durans</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(100)	-	-
<i>E. mundii</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1(100)	-	-	-
<i>E. dispar</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(100)	-
TOPLAM(n=77)	-	-	3(3,8)	2(2,6)	9(11,7)	25(32,5)	5(6,5)	-	18(23,4)	13(16,9)	2(2,6)	-

Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının slime oluşumlarına bakıldığında 102 (%68) slime (+), 48 (%32) slime (-) izolat tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5' teki sonuçlarımıza göre, balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 19'u(%67,9) *E.spp*, 16'sı(%64) *E.casseliflavus*, 14'ü(%66,7) *E.flavescens*, 14'ü(%70) *E.gallinarum*, 8'i(%61,5) *E.raffinosis*, 8'i(%66,7) *E.solitarius*, 8'i(%72,7) *E.pseudoavium*, 4'ü(%66,7)*E.avium*, 6'sı (%100) *E.faecalis*, 3'ü(%100) *E.malodoratus*, 1'i(%100)*E.hirae* ve 1'i(%100) *E.dispar* slime (+) olarak bulunmuştur.

Tatlısu balık örneklerinden izole edilen 73 izolatın 56'sı (%76,7) slime (+), 17'si (%23,3) slime (-)'dir(Çizelge 4.6). Deniz balıklarından izole edilen 77 izolatın 47'si (%61) slime (+), 30'u (%39) slime(-) 'dir (Çizelge 4.7).

Tatlı su balıklarından izole edilen *Enterococcus* izolatının TSB'de biyofilm üretimine baktığımızda, 73 izolatın 16'sı(%21,9) kuvvetli pozitif, 38'i (%52,1) orta, 17'si (%23,3)

Çizelge 4.12. Deniz balıklarından izole edilen jelatinaz (+) ve jelatinaz (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

<i>Enterococcus</i> Türleri	<i>Sarda sarda</i> (Palamut)				<i>Dicentrarchus labrax</i> (Deniz levgi)				<i>Spusauratus</i> (Çipura)			
	Jelatinaz(+)		Jelatinaz(-)		Jelatinaz(+)		Jelatinaz(-)		Jelatinaz(+)		Jelatinaz(-)	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>Enterococcus</i> spp.(n=15)	–	–	1	6,7	2	13,3	6	40	–	–	6	40
<i>E. casseliflavus</i> (n=11)	–	–	–	–	–	–	6	54,5	–	–	5	45,5
<i>E. flavescens</i> (n=11)	–	–	–	–	1	9,1	4	36,4	–	–	6	54,5
<i>E. gallinarum</i> (n=12)	–	–	–	–	–	–	7	58,3	–	–	5	41,7
<i>E. raffinosus</i> (n=11)	–	–	–	–	–	–	8	72,7	–	–	3	27,3
<i>E. solitarius</i> (n=6)	–	–	–	–	–	–	3	50	–	–	3	50
<i>E. pseudoavium</i> (n=3)	1	33,3	2	66,7	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. avium</i> (n=2)	–	–	–	–	–	–	1	50	–	–	1	50
<i>E. faecalis</i> (n=1)	–	–	1	100	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E. durans</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E. mundtii</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E. dispar</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
TOPLAM(n=77)	1	1,3	4	5,2	3	3,9	36	46,7	–	–	33	42,9

Çizelge 4.13. Balık örneklerinden izole edilen jelatinaz (+) ve jelatinaz (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

<i>Enterococcus</i> Türleri	Jelatinaz oluşumu			
	Jelatinaz(+)		Jelatinaz(-)	
	n	%	n	%
<i>E. spp</i> (n=28)	7	25	21	75
<i>E. casseliflavus</i> (n=25)	–	–	25	100
<i>E. flavescens</i> (n=21)	1	4,8	20	95,2
<i>E. gallinarum</i> (n=20)	–	–	20	100
<i>E. raffinosus</i> (n=13)	–	–	13	100
<i>E. solitarius</i> (n=12)	1	8,3	11	91,7
<i>E. pseudoavium</i> (n=11)	5	45,5	6	54,5
<i>E. avium</i> (n=6)	1	16,7	5	83,3
<i>E. faecalis</i> (n=6)	4	66,7	2	33,3
<i>E. malodoratus</i> (n=3)	–	–	3	100
<i>E. faecium</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E. hirae</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E. durans</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E. mundtii</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E. dispar</i> (n=1)	–	–	1	100
TOPLAM(n=150)	19	12,7	131	87,3
n: İzolat sayısı				

Çizelge 4.14. Tatlı su balıklarından izole edilen Dnaz (+) ve Dnaz (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

<i>Enterococcus</i> Türleri	<i>Cyprinus carpio</i> (Sazan)				<i>Salmo trutta</i> (Alabalık)				<i>Salmo salar</i> (Somon)			
	Dnaz(+)		Dnaz(-)		Dnaz(+)		Dnaz(-)		Dnaz(+)		Dnaz(-)	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>Enterococcus</i> spp. (n=13)	–	–	1	7,7	4	30,8	1	7,7	3	23	4	30,8
<i>E. casseliflavus</i> (n=14)	–	–	–	–	5	35,7	–	–	6	42,9	3	21,4
<i>E. flavescens</i> (n=10)	–	–	–	–	2	20	–	–	7	70	1	10
<i>E. gallinarum</i> (n=8)	–	–	–	–	3	37,5	1	12,5	4	50	–	–
<i>E. raffinosus</i> (n=2)	–	–	–	–	2	100	–	–	–	–	–	–
<i>E. solitarius</i> (n=6)	–	–	–	–	3	50	–	–	2	33,3	1	16,7
<i>E. pseudovarium</i> (n=8)	–	–	–	–	1	12,5	–	–	4	50	3	37,5
<i>E. avium</i> (n=4)	1	25	–	–	–	–	–	–	1	25	2	50
<i>E. faecalis</i> (n=5)	–	–	–	–	–	–	–	–	3	60	2	40
<i>E. malodoratus</i> (n=3)	2	66,7	–	–	–	–	–	–	1	33,3	–	–
TOPLAM (n=73)	3	4,1	1	1,4	20	27,4	2	2,7	31	42,5	16	21,9

Çizelge 4.15. Deniz balıklarından izole edilen Dnaz (+) ve Dnaz (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

<i>Enterococcus</i> Türleri	<i>Sarda sarda</i> (Palamut)				<i>Dicentrarchus labrax</i> (Deniz levgi)				<i>Spicara auratus</i> (Çipura)			
	Dnaz(+)		Dnaz(-)		Dnaz(+)		Dnaz(-)		Dnaz(+)		Dnaz(-)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus</i> spp. (n=15)	–	–	1	6,7	8	53,3	–	–	6	40	–	–
<i>E. casseliflavus</i> (n=11)	–	–	–	–	6	54,5	–	–	5	45,5	–	–
<i>E. flavescens</i> (n=11)	–	–	–	–	5	45,45	–	–	5	45,45	1	9,1
<i>E. gallinarum</i> (n=12)	–	–	–	–	7	58,3	–	–	5	41,7	–	–
<i>E. raffinosus</i> (n=11)	–	–	–	–	8	72,7	–	–	3	27,3	–	–
<i>E. solitarius</i> (n=6)	–	–	–	–	3	50	–	–	3	50	–	–
<i>E. pseudovarium</i> (n=3)	2	66,7	1	33,3	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. avium</i> (n=2)	–	–	–	–	1	50	–	–	1	50	–	–
<i>E. faecalis</i> (n=1)	1	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> (n=1)	–	–	–	–	1	100	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–
<i>E. durans</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–
<i>E. mundii</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–
<i>E. dispar</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–
TOPLAM (n=77)	3	3,9	2	2,6	39	50,6	–	–	32	41,6	1	1,3

Çizelge 4.18. Deniz balıklarından izole edilen Hemoliz (+) ve Hemoliz (-) *Enterococcus* türlerinin dağılımları

Enterococcus Türleri	<i>Sarda sarda</i> (Palamut)				<i>Dicentrarchus labrax</i> (Deniz levreği)				<i>Sparus auratus</i> (Çipura)			
	Hemoliz(+)		Hemoliz(-)		Hemoliz (+)		Hemoliz (-)		Hemoliz (+)		Hemoliz (-)	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>Enterococcus</i> spp.(n=15)	–	–	1	6,7	1	6,7	7	46,7	–	–	6	40
<i>E.casseliflavus</i> (n=11)	–	–	–	–	–	–	6	54,5	–	–	5	45,5
<i>E.flavescens</i> (n=11)	–	–	–	–	–	–	5	45,5	–	–	6	54,5
<i>E.gallinarum</i> (n=12)	–	–	–	–	–	–	7	58,3	–	–	5	41,7
<i>E.raffinosis</i> (n=11)	–	–	–	–	–	–	8	72,7	–	–	3	27,3
<i>E.solitarius</i> (n=6)	–	–	–	–	–	–	3	50	–	–	3	50
<i>E.pseudoavium</i> (n=3)	–	–	3	100	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.avium</i> (n=2)	–	–	–	–	–	–	1	50	–	–	1	50
<i>E.faecalis</i> (n=1)	–	–	1	100	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.faecium</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	1	100	–	–	–	–
<i>E.hirae</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E.durans</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E.mundtii</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
<i>E.dispar</i> (n=1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	100
TOPLAM(n=77)	–	–	5	6,5	1	1,3	38	49,4	–	–	33	42,8

Çizelge 4.19. Balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin hemoliz (+) ve hemoliz (-) dağılımları

Enterococcus türleri	Hemoliz Oluşumu			
	Hemoliz (+)		Hemoliz (-)	
	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>Enterococcus</i> spp.(n=28)	1	3,6	27	96,4
<i>E.casseliflavus</i> (n=25)	–	–	25	100
<i>E.flavescens</i> (n=21)	–	–	21	100
<i>E.gallinarum</i> (n=20)	–	–	20	100
<i>E.raffinosis</i> (n=13)	–	–	13	100
<i>E.solitarius</i> (n=12)	1	8,3	11	91,7
<i>E.pseudoavium</i> (n=11)	–	–	11	100
<i>E.avium</i> (n=6)	1	16,7	5	83,3
<i>E.faecalis</i> (n=6)	–	–	6	100
<i>E.malodorans</i> (n=3)	–	–	3	100
<i>E.faecium</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.hirae</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.durans</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.mundtii</i> (n=1)	–	–	1	100
<i>E.dispar</i> (n=1)	–	–	1	100
TOPLAM(n=150)	3	2	147	98

Çizelge 4.12'deki sonuçlara göre balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 19'u(%12,7) jelatinaz (+), 131'i (%87,3) jelatinaz (-) olarak bulunmuştur. Elde edilen *Enterococcus* izolatlarının 7'si(% 25) *E.spp*, 5'i(%45,5) *E.pseudoavium* 4'ü(%66,7) *E.faecalis*, 1'i(%16,7)*E.avium*, 1'i(%8,3) *E.solitarius*jelatinaz (+) olarak tanımlanırken diğer *Enterococcus* izolatlarında jelatinaz aktivitesi negatif sonuç vermiştir.

Deniz balıklarından elde edilen 77 izolatın jelatinaz aktivitesi incelendiğinde, 4'ü(%5,2) jelatinaz (+) sonuç verirken 73'ü(% 94,8) jelatinaz (-) olarak bulunmuştur(Çizelge 4.11). Tatlı su balık örneklerinden izole edilen 73 izolatın 15'i(%20,6) jelatinaz (+), 58'i(%79,4) jelatinaz (-) 'dir(Çizelge 4.10).

Çizelge 4.15'deki sonuçlara baktığımızda, balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 128'i(%85,3) DNaz (+), 22'si(%14,7) DNaz (-)'dir. İzolatların 21'i(%75) *E.spp*, 22'si(%88) *E.casseliflavus*, 19'u(%90,5) *E.flavescens*, 19'u(%95) *E.gallinarum*, 13'ü(%100) *E.raffinosis*, 11'i(%91,7) *E.solitarius*, 7'si(%63,6) *E.pseudoavium*, 4'ü(%66,7) *E.avium*, 4'ü(%66,7) *E.faecalis*, 3'ü(%100) *E.malodoratus*, 1'i(%100) *E.faecium*, 1'i(%100) *E.hirae*, 1'i(%100) *E.durans*, 1'i(%100) *E.mundtii* ve 1'i(%100) *E.dispar* DNaz (+) olarak tanımlanmıştır.

Tatlı su balık örneklerinden izole edilen 73 izolatın DNaz aktivitesi incelendiğinde 54'ü(%74) DNaz (+), 19'u(% 26) DNaz (-) olarak bulunmuştur. Deniz balıklarından izole edilen 77 izolatın 74'ü(%96,1) DNaz (+) 3'ü(%3,9) DNaz (-) olarak tespit edilmiştir(Çizelge 4.13 ve 4.14).

Çizelge 4.18'de balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının hemoliz oluşumlarına bakılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde 150 izolatın 3'ü(%2) hemoliz (+) 147'si(%98,7) hemoliz (-)'dir. İzolatların 1'i(%3,6) *E.spp*, 1'i(%8,3) *E.solitarius*, 1'i(%16,7) *E.avium*hemoliz (+) olarak bulunmuştur.

Deniz balıklarından elde edilen 77 izolatın hemoliz oluşumları incelendiğinde 76'sı(%98,7) hemoliz (-) olarak belirlenirken yalnızca 1'i(%1,3) hemoliz (+) olarak tanımlanmıştır. Tatlı su balık örneklerinden elde edilen 73 izolatın ise 2'si(%2,7) hemoliz (+), 71'i(%97,3) hemoliz (-)'dir.

Çizelge 4.21. Deniz balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus*'ların antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotikler	LEVREK (solungaç,bağırsak)n=39						ÇİPURA (solungaç,bağırsak)n=33						PALAMUT(solungaç,bağırsak)n=5						TOPLAM(n=77)					
	R		I		S		R		I		S		R		I		S		R		I		S	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AM	34	87,2	–	–	5	12,8	33	100	–	–	–	–	4	80	–	–	1	20	71	92,2	–	–	6	7,8
VA	17	43,6	20	51,3	2	5,1	17	51,5	11	33,3	5	15,2	–	–	1	20	4	80	34	44,1	32	41,6	11	14,3
NV	19	48,7	14	35,9	6	15,4	11	33,3	16	48,5	6	18,2	4	80	–	–	1	20	34	44,1	30	39	13	16,9
TEC	1	2,6	18	46,2	20	51,3	2	6,1	7	21,2	24	72,7	–	–	–	–	5	100	3	3,9	25	32,5	49	63,6
CIP	21	53,9	16	41	2	5,1	17	51,5	14	42,4	2	6,1	–	–	–	–	5	100	38	49,3	30	39	9	11,7
E	26	66,7	11	28,2	2	5,1	23	69,7	10	30,3	–	–	1	20	–	–	4	80	50	64,9	21	27,3	6	7,8
CN	4	10,2	18	46,2	17	43,6	12	36,4	6	18,2	15	45,4	–	–	1	20	4	80	16	20,8	25	32,5	36	46,7
TE	23	59	9	23,1	7	17,9	26	78,8	1	3	6	18,2	4	80	1	20	–	–	53	68,8	11	14,3	13	16,9
F	18	46,2	10	25,6	11	28,2	9	27,3	12	36,4	12	36,4	–	–	1	20	4	80	27	35,1	23	29,9	27	35
C	13	33,3	13	33,3	13	33,3	11	33,3	11	33,3	11	33,3	–	–	2	40	3	60	24	31,2	26	33,8	27	35
n= <i>Enterococcus</i> izolat sayısı, AM; ampisilin, VA; vankomisin, TEC; teikoplanin, CIP; siprofloksasin, E; eritromisin, CN; gentamisin, TE; tetrasiklin, F; nitrofurantoin, C; kloramfenikol, NV; novobiosin, S: hassas, R: dirençli, I : arada																								

Çizelge 4.19'a göre, tatlı su balık örneklerinden izole edilen 73 *Enterococcus* izolatının 61'i(%83,6) ampisiline, 41'i(56,2) vankomisine, 68'i (%93,2) novobiosine, 18'i (%24,6) teikoplanine, 26'sı(%35,6) siprofloksasine, 24'ü(%32,9) eritromisine, 14'ü(%19,2) gentamisine, 40'ı(%54,8) tetrasikline, 18'i (%24,7) nitrofurantoine ve 21'i(%28,8) kloramfenikole dirençli bulunmuştur.

Çizelge 4.20'deki sonuçlarımıza göre, deniz balıklarından izole edilen 77 *Enterococcus* izolatının antibiyotik dirençlilikleri incelendiğinde, 71'i(%92,2) ampisiline, 34'ü(44,1) vankomisine, 34'ü(%44,1) novobiosine, 3'ü(%3,9) teikoplanine, 38'i(%49,3) siprofloksasine, 50'si(%64,9) eritromisine, 16'sı(%20,8) gentamisine, 53'ü(%68,8) tetrasikline, 27'si (%35,1) nitrofurantoine ve 24'ü(%31,2) kloramfenikole dirençli bulunmuştur.

Çizelge 4.22. Balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin 4°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Enterococcus</i> <i>türleri</i>	İzolat sayısı	Proteolitik aktivite			
		20 mm ≥ (+++)(%)	10-20 mm (++) (%)	0-10 mm (+) (%)	Negatif (-) (%)
<i>E.spp</i>	n=28	7(25)	12(42,9)	6(21,4)	3(10,7)
<i>E.casseliflavus</i>	n=25	4(16)	14(56)	3(12)	4(16)
<i>E.flavescens</i>	n=21	4(19,05)	12(57,1)	4(19,05)	1(4,8)
<i>E.gallinarum</i>	n=20	1(5)	10(50)	5(25)	4(20)
<i>E.raffinosis</i>	n=13	1(7,7)	10(76,9)	1(7,7)	1(7,7)
<i>E.solitarius</i>	n=12	—	5(41,7)	2(16,7)	5(41,7)
<i>E.pseudoavium</i>	n=11	4(36,4)	2(18,2)	1(9,1)	4(36,4)
<i>E.avium</i>	n=6	1(16,7)	1(16,7)	1(16,7)	3(50)
<i>E.faecalis</i>	n=6	—	5(83,3)	1(16,7)	—
<i>E.malodoratus</i>	n=3	—	—	1(33,3)	2(66,7)
<i>E.faecium</i>	n=1	1(100)	—	—	—
<i>E.hirae</i>	n=1	—	1(100)	—	—
<i>E.durans</i>	n=1	—	—	1(100)	—
<i>E.mundtii</i>	n=1	—	1(100)	—	—
<i>E.dispar</i>	n=1	1(100)	—	—	—
Toplam	n =150	24(16)	73(48,7)	26(17,3)	27(18)
(+++)					
(++)					
(+))					
n: İzolat sayısı					

Çizelge 4.23. Balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin 20°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Enterococcus</i> türleri	İzolat sayısı	Proteolitik aktivite			
		20 mm $\geq$ (+++)(%)	10-20 mm (++) (%)	0-10 mm (+) (%)	Negatif (-) (%)
<i>E.spp</i>	n=28	6(21,4)	5(17,9)	–	17(60,7)
<i>E.casseliflavus</i>	n=25	5(20)	2(8)	–	18(72)
<i>E.flavescens</i>	n=21	5(23,8)	2(9,5)	1(4,8)	13(61,9)
<i>E.gallinarum</i>	n=20	3(15)	1(5)	–	16(80)
<i>E.raffinosis</i>	n=13	–	1(7,7)	1(7,7)	11(84,6)
<i>E.solitarius</i>	n=12	3(25)	–	–	9(75)
<i>E.pseudoavium</i>	n=11	4(36,4)	–	2(18,2)	5(45,4)
<i>E.avium</i>	n=6	2(33,3)	–	–	4(66,7)
<i>E.faecalis</i>	n=6	1(16,7)	1(16,7)	–	4(66,7)
<i>E.malodoratus</i>	n=3	1(33,3)	1(33,3)	–	1(33,3)
<i>E.faecium</i>	n=1	–	–	–	1(100)
<i>E.hirae</i>	n=1	–	–	–	1(100)
<i>E.durans</i>	n=1	–	–	–	1(100)
<i>E.mundtii</i>	n=1	–	–	–	1(100)
<i>E.dispar</i>	n=1	1(100)	–	–	–
Toplam	n =150	31(20,7)	13(8,7)	4(2,7)	102(68)
(+++ kuvvetli pozitif, (++) orta derecede pozitif, (+) zayıf pozitif n: İzolat sayısı					

Çizelge 4.24. Balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin 37°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Enterococcus</i> türleri	İzolat sayısı	Proteolitik aktivite			
		20 mm $\geq$ (+++)(%)	10-20 mm (++) (%)	0-10 mm (+) (%)	Negatif (-) (%)
<i>E.spp</i>	n=28	6(21,4)	10(35,7)	3(10,7)	9(32,1)
<i>E.casseliflavus</i>	n=25	10(40)	7(28)	8(32)	–
<i>E.flavescens</i>	n=21	9(42,9)	5(23,8)	6(28,6)	1(4,8)
<i>E.gallinarum</i>	n=20	8(40)	3(15)	7(35)	2(10)
<i>E.raffinosis</i>	n=13	3(23,1)	7(53,8)	3(23,1)	–
<i>E.solitarius</i>	n=12	3(25)	3(25)	4(33,3)	2(16,7)
<i>E.pseudoavium</i>	n=11	–	2(18,2)	2(18,2)	7(63,6)
<i>E.avium</i>	n=6	–	2(33,3)	1(16,7)	3(50)
<i>E.faecalis</i>	n=6	1(16,7)	1(16,7)	1(16,7)	3(50)
<i>E.malodoratus</i>	n=3	1(33,3)	1(33,3)	1(33,3)	–
<i>E.faecium</i>	n=1	–	1(100)	–	–
<i>E.hirae</i>	n=1	–	–	1(100)	–
<i>E.durans</i>	n=1	–	–	–	1(100)
<i>E.mundtii</i>	n=1	1(100)	–	–	–
<i>E.dispar</i>	n=1	–	–	1(100)	–
Toplam	n =150	42(28)	42(28)	38(25,3)	28(18,7)
(+++ kuvvetli pozitif, (++) orta derecede pozitif, (+) zayıf pozitif					

Çizelge 4.21'deki sonuçlara göre, balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 4°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçları incelendiğinde, 24'ü(%16) kuvvetli pozitif, 73'ü(%48,7) orta derecede pozitif, 26'sı (%17,3) zayıf pozitif ve 27'si(%18) negatif sonuç vermiştir.

E.spp olarak tanımlanan izolatların 7'si(%25) kuvvetli pozitif, 12'si(%42,9) orta derecede pozitif, 6'sı(%21,4) zayıf pozitif ve 3'ü(%10,7) negatif sonuç vermiştir. *E. casseliflavus* olarak tanımlanan izolatların 4'ü(%10,6) kuvvetli pozitif, 14'ü(%56) orta derecede pozitif, 3'ü(%12) zayıf pozitif ve 4'ü(%16) negatif sonuç vermiştir. *E. flavescens* olarak tanımlanan izolatların 4'ü(19,05) kuvvetli pozitif, 12'si(%57,1) orta derecede pozitif, 4'ü(%19,05) zayıf pozitif ve 1'i(%4,8) negatif olarak tespit edilmiştir.

E. gallinarum olarak tespit edilen izolatların 1'i(%5) kuvvetli pozitif, 10'u(%50) orta derecede pozitif, 5'i(%25) zayıf pozitif ve 4'ü(%20) negatif sonuç vermiştir. *E.raffinosis* olarak belirlenen izolatların 1'i(%7,7) kuvvetli pozitif, 10'u(%76,9) orta derecede pozitif 1'i(%7,7) zayıf pozitif olarak bulunurken 1'i(%7,7) negatif olarak bulunmuştur.

E. solitarius olarak tanımlanan izolatların 5'i(%41,7) orta derecede pozitif, 2'si(% 16,7) zayıf pozitif sonuç verirken, 5'i(%41,7) negatif sonuç vermiştir. *E. pseudoavium* olarak tanımlanan izolatların 4'ü(%36,4) kuvvetli pozitif, 2'si(%18,2) orta derecede pozitif, 1'i(%9,1) zayıf pozitif olarak bulunurken 4'ü(%36,4) negatif sonuç vermiştir. *E.avium* 1'i(%16,7) kuvvetli pozitif, 1'i(%16,7) orta derecede pozitif, 1'i(%16,7) zayıf pozitif sonuç verirken 3'ü(%50) negatif sonuç vermiştir.

E.faecalis olarak belirlenen izolatların 5'i(%83,3) orta derecede pozitif olarak bulunurken 1'i(%16,7) zayıf pozitif sonuç vermiştir. *E.malodoratus* olan izolatların 1'i(%33,3) zayıf pozitif sonuç verirken 2'si(%66,7) negatif sonuç vermiştir.

4°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçlarına göre *E.faecium* olarak belirlenen izolat kuvvetli pozitif, *E.hirae* olarak tanımlanan izolat orta derecede pozitif, *E.durans* izolatı zayıf pozitif, *E.mundtii* izolatı orta derecede pozitif sonuç verirken *E.dispar* kuvvetli pozitif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.22'deki sonuçlarımıza göre, balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 20°C'dekiproteolitik enzim aktivite sonuçları incelendiğinde, 31'i(%20,7) kuvvetli pozitif, 13'ü(%8,7) orta derecede pozitif, 4'ü (%2,7) zayıf pozitif sonuç verirken 102'si(%68) negatif sonuç vermiştir.

E.spp olarak tanımlanan izolatların 6'si(%21,4) kuvvetli pozitif, 5'i(%17,9) orta derecede pozitif ve 17'si(%60,7) negatif sonuç vermiştir. *E. casseliflavs* olarak tanımlanan izolatların 5'i(%20) kuvvetli pozitif, 2'si(%8) orta derecede pozitif ve 18'i(%72) negatif sonuç vermiştir. *E. flavescens* olarak tanımlanan izolatların 5'i(%23,8) kuvvetli pozitif, 2'si(%9,5) orta derecede pozitif, 1'i(%4,8) zayıf pozitif ve 13'ü(%61,9) negatif olarak tespit edilmiştir.

E. gallinarum olarak tespit edilen izolatların 3'ü(%15) kuvvetli pozitif, 1'i(%5) orta derecede pozitif ve 16'sı(%80) negatif sonuç vermiştir. *E.raffinosis* olarak belirlenen izolatların 1'i(%7,7) orta derecede pozitif 1'i(%7,7) zayıf pozitif olarak bulunurken 11'i(%84,6) negatif olarak bulunmuştur.

E. solitarius olarak tanımlanan izolatların 3'ü(%25) kuvvetli pozitif sonuç verirken 9'u(%75) negatif sonuç vermiştir. *E. pseudoavium* olarak tanımlanan izolatların 4'ü(%36,4) kuvvetli pozitif, 2'si(%18,2) zayıf pozitif olarak bulunurken 5'i(%45,4) negatif sonuç vermiştir. *E.avium* 2'si(23,3) kuvvetli pozitif sonuç verirken 4'ü(%66,7) negatif sonuç vermiştir.

E.faecalis olarak belirlenen izolatların 1'i(%16,7) kuvvetli pozitif, 1'i(%16,7) orta derecede pozitif olarak bulunurken 4'ü(%66,7) negatif sonuç vermiştir. *E.malodoratus* olan izolatların 1'i(%33,3) kuvvetli pozitif, 1'i(%33,3) orta derecede pozitif sonuç verirken 1'i(%33,3) negatif sonuç vermiştir.

20°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçlarına göre *E.faecium* olarak belirlenen izolat negatif, *E.hirae* olarak tanımlanan izolat negatif, *E.durans* izolatı negatif, *E.mundtii* izolatı negatif sonuç verirken *E.dispar* kuvvetli pozitif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.23'de verilen sonuçlara göre, balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 37°C'dekiproteolitik enzim aktivite sonuçları incelendiğinde, 42'si(%28)

kuvvetli pozitif, 42'si(%28) orta derecede pozitif, 38'i (%25,3) zayıf pozitif ve 28'i(%18,7) negatif sonuç vermiştir.

E.spp olarak tanımlanan izolatların 6'sı(%21,4) kuvvetli pozitif, 10'u(%35,7) orta derecede pozitif, 3'ü(%10,7) zayıf pozitif ve 9'u(%32,1) negatif sonuç vermiştir. *E. casseliflavs* olarak tanımlanan izolatların 10'u(%40) kuvvetli pozitif, 7'si(%28) orta derecede pozitif, 8'i(%32) zayıf pozitif sonuç vermiştir. *E. flavescens* olarak tanımlanan izolatların 9'u(%42,9) kuvvetli pozitif, 5'i(%23,8) orta derecede pozitif, 6'sı(%28,6) zayıf pozitif ve 1'i(%4,8) negatif olarak tespit edilmiştir.

E. gallinarum olarak tespit edilen izolatların 8'i(%40) kuvvetli pozitif, 3'ü(%15) orta derecede pozitif, 7'si(%35) zayıf pozitif ve 2'si(%10) negatif sonuç vermiştir. *E.raffinosis* olarak belirlenen izolatların 3'ü(%23,1) kuvvetli pozitif, 7'si(%53,8) orta derecede pozitif ve 3'ü(%23,1) zayıf pozitif olarak bulunmuştur.

E. solitarius olarak tanımlanan izolatların 3'ü(%25) kuvvetli pozitif, 3'ü(%25) orta derecede pozitif, 4'ü(% 33,3) zayıf pozitif sonuç verirken, 2'si(%16,7) negatif sonuç vermiştir. *E. pseudoavium* olarak tanımlanan izolatların 2'si(%18,2) orta derecede pozitif, 2'si(%18,2) zayıf pozitif olarak bulunurken 7'si(%63,6) negatif sonuç vermiştir. *E.avium* 2'si(%33,3) orta derecede pozitif, 1'i(%16,7) zayıf pozitif sonuç verirken 3'ü(%50) negatif sonuç vermiştir.

E.faecalis olarak belirlenen izolatların 1'i(%16,7) kuvvetli pozitif, 1'i(%16,7) orta derecede pozitif, 1'i(%16,7) zayıf pozitif sonuç ve 3'ü(%50) negatif sonuç vermiştir. *E.malodoratus* olan izolatların 1'i(%33,3) kuvvetli pozitif, 1'i(%33,3) orta derecede pozitif ve 1'i(%33,3) zayıf pozitif sonuç vermiştir.

37°C'deki proteolitik enzim aktivite sonuçlarına göre *E.faecium* olarak belirlenen izolat orta derecede kuvvetli pozitif, *E.hirae* olarak tanımlanan izolat zayıf pozitif, *E.durans* izolatı negatif, *E.mundtii* izolatı kuvvetli pozitif sonuç verirken *E.dispar* zayıf pozitif sonuç vermiştir.

Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının 30°C'deki lipolitik enzim aktivitelerine bakılmıştır ve sonuçlar değerlendirildiğinde pozitif sonuç elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Mikroorganizmaların kontrol altına alınmasında kullanılan yöntemlerin uygulanmasıyla tüketiciye sunulan gıdanın güvenliğini garanti etmede en önemli nokta, tehlike analizleri ve kritik kontrol noktaları (HACCP) kavramının su ürünleri işletmelerinde uygulamaya konulmasıdır. HACCP, birçok ülkede su ürünleri sektöründe başarı ile uygulanmaktadır. Temel amaç, gıda güvenliğini tehlikeye sokan zararların önlenmesi olmasına karşın, tüm sistemde oluşturulan işlem kontrolü nedeniyle düşük maliyetin yanı sıra ürün kalitesinde de artışa neden olmaktadır [28].

Halk sağlığı ele alındığında tüketilmesi ön görülen balıkların mikrobiyolojik açıdan bazı hijyen parametrelerini taşıması gerekmektedir. Balıkların kas dokularının diğer memeli hayvanlara oranla çok daha hızlı bozulması, avlanmadan tüketilinceye kadar geçen sürede mikroorganizmaların ve diğer etkenlerin etkisine maruz kalmasından dolayı balık eti, tazeliğini ve kalitesini kaybedebilmektedir [7].

Enterococcus 'lar pH, sıcaklık ve tuza karşı olan dirençleri sayesinde, gıda üretimi sırasında canlı kalarak son ürünü de kontamine edebilirler. Bu sebeple gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilirken, fermente gıdalarda kötü hijyen koşullarının göstergesi değildirler. Bu bakteriler birçok gıdada doğal olarak bulunan ve çeşitli gıdaların fermentasyonunda rol oynayan önemli mikroorganizmalardır [50].

Bu araştırmada Ankara'da tüketime sunulan balık örneklerinden (solungaç ve bağırsaklarıyla)*Enterococcus* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Tanımlamaları yapılan *Enterococcus* türlerinin slime, dnaz, jelatinaz ve hemolitik aktiviteleri, biyofilm oluşumları, 4°C, 20°C ve 37°C'deki proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri araştırılmıştır. *Enterococcus* türlerinin antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir.

Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* cinsine ait 150 izolatın 28'i (%18,7) *E. spp.*, 25'i (%16,7) *E. casseliflavus*, 21'i (%14) *E. flavescens*, 20'si (%13,3), *E. gallinarum*, 13'ü (%8,7) *E. raffinosus*, 12'si (%8) *E. solitarius*, 11'i (%7,3) *E. pseudoavium*, 6'sı (%4) *E. avium*, 6'sı (%4) *E. faecalis*, 3'ü (%2) *E. malodoratus*, 1'i (%0,7) *E. faecium*, 1'i (%0,7) *E. hirae*, 1'i (%0,7) *E. durans*, 1'i (%0,7) *E. mundtii*, 1'i (%0,7) *E. dispar* olarak tanımlanmıştır.

Tatlı su balıklarından izole edilen *Enterococcus* türlerine ait 73 izolattan 13'ü(% 17,8) *E.spp*, 14'ü(% 19,2) *E.casseliflavus*, 10'u(% 13,7) *E.flavescens*, 8'i(% 11) *E.gallinarum*, 2'si(% 2,7) *E.raffinosis*, 6'sı(% 8,2) *E.solitarius*, 8'i(% 11) *E.pseudoavium*, 4'ü(% 5,5) *E.avium*, 5'i(% 6,8) *E.faecalis* ve 3'ü(% 4,1) *E.malodoratus* olarak bulunmuştur.

Deniz balıklarından izole edilen *Enterococcus* türlerine ait 77 izolattan 15'i(% 19,5) *E.spp*, 11'i(% 14,3) *E.casseliflavus*, 11'i(% 14,3) *E.flavescens*, 12'si(% 15,6) *E.gallinarum*, 11'i(% 14,3) *E.raffinosis*, 6'sı(% 7,8) *E.solitarius*, 3'ü(% 3,9) *E.pseudoavium*, 2'si(% 2,6) *E.avium*, 1'i(% 1,3) *E.faecalis* , 1'i(% 1,3) *E.faecium* , 1'i(% 1,3) *E.hirae*, 1'i(% 1,3) *E.durans*, 1'i(% 1,3) *E.mundtii* ve 1'i(% 1,3) *E.dispar* olarak bulunmuştur.

Çıtak ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada, dondurulmuş 120 et ve sebze örneğinden toplam 63 (% 52,5) *Enterococcus* türü izole edilmiştir. Bunların %63,4'ünün fekal enterokok olduğu ve % 70'inde *E. faecalis*, %30'unda ise *E. faecium* olduğu belirlenmiştir [174].

Tansuphasin ve arkadaşlarının 2006 yılında dondurulmuş 103 hayvansal kaynaklı (tavuk, karides) örnek üzerindeki çalışmasında da 113 *Enterococcus* izolatının içinde en yüksek sıklıkta *E. faecalis* (% 28.9), *E. faecium* (% 8.8), olmak üzere *E. durans* (% 4.2), *E. raffinosis* (% 0.8)ve diğer türler (*E. avium*, *E. mallodoratus*, *E. hirae*, *E. gallinarum*) % 4.6 oranında tespit etmişlerdir [175].

Macovei ve Zurek'in 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada, et, süt ve peynirden izole edilen *Enterococcus* suşlarının dağılım oranı, *Enterococcus faecalis* %88.2, *E. faecium*%6.8, *E. casseliflavus*%9 olarak saptanmıştır [176].

Devriese ve arkadaşlarının 1995 yılında taze ve hazır gıda örnekleriyle yaptıkları çalışmada izole ettikleri 161 *Enterococcus* izolatının 94(% 58,3)'ü *E. faecalis*, 71(% 44,1)'i *E. faecium* ve 15(% 9,3)'i de *E. hirae* veya *E. durans* olarak tanımlanmıştır [81].

Çıtak, Tansuphasin, Macovei ve Devriese'nin çalışmalarında *E. faecium* ve *E. faecalis*'in yüksek sıklıkla, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium* ve *E. gallinarum* türlerini daha az sıklıkla izole edilmesi bizim çalışmamızla uygunluk göstermezken, *E. faecalis* izolasyonunu *E.*

faecium izolasyonundan daha fazla sıklıkla izole edilmesi bizim çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Svec ve ark. (1999), su örnekleri ile yapmış oldukları çalışmada %5 *E. mundtii*, %4 *E. hirae*, %3 *E. casseliflavus*, %3 *E. gallinarum* ve % 3 *E. durans* ve bir izolat *E. avium* izole etmesi bunların fekal kirliliğin göstergesi olarak belirtmektedir [177].

Sonuçlarımıza göre düşük oranda da olsa balıklardan izole edilen *E. hirae* (%0,7), *E.mundtii* (%0,7), *E. durans* (%0,7) ve *E. dispar*'ın (%0,7) fekal orijinli olarak yıkama sularında, çeşitli kontaminasyon faktörler ile çoğalabildiğini ve son ürünlerde bulunabildiğini göstermektedir.

Kasımoğlu ve ark.(2010), Ankara çevresinde tavuklarla yaptıkları çalışmada %48 oranında *E. faecium*, %23 oranında *E. durans*, %19 oranında *E. faecalis* izole etmişlerdir. Bu türlerden daha az oranda ise *E. hirae*, *E. mundtii*, *E.casseliflavus* elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda *E. faecium* (%24,6) oranı *E. faecalis*'ten (%35,4) daha az olduğu için bu sonuçlar bizim çalışmamızı desteklememektedir. Ayrıca *E. faecium* ve *E. faecalis* izole edilmesi fekal kirliliğin de göstergesidir [178].

Karabıyık (2011), 80 fermente et örneği ile yapmış oldukları çalışmada, 134 *Enterococcus* izole etmişlerdir. 134 *Enterococcus* izolatın, 79'u (%59) *E. faecium*, 35'i (%26.1) *E. faecalis*, 13'ü (%9.7) *E. gallinarum*, 5'i (%3.7) *E. durans*, 1'i (%0.7) *E. avium* ve 1'i (%0.7) *E. hirae* olarak tespit etmiştir[41]. *E. faecium* ve *E. faecalis*'in daha fazla sıklıkla izole edilmesi bizim sonuçlarımızı desteklememektedir.

Hammad ve ark.(2015), Mısırdan peynirle yapmış oldukları çalışmada, 90 örnekten 120 *Enterococcus* izolatı elde edilmiştir. 120 izolatın 37'si(%30,8) *E. faecium*, 13'ü(%10,8)*E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Bizim sonuçlarımızda daha az oranda *E. faecium*ve*E. faecalistes*pit edilmiştir [179].

Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarında slime, jelatinaz, DNaz ve hemoliz gibi bazı virulans faktörlerine bakılmıştır.

Enterococcus'ların virulansları ile ilgili en önemli faktörlerden biri slime/biyofilm oluşumudur. Bu multiselüler kompleksler kolonilerin etrafındaki ekzopolisakkarit yapıdaki

matrikslerdir. Kolonilerin çeşitli yüzeylere yapışmalarını sağlamalarının dışında, bakteriyi fagositozdan ve antimikrobiyal maddelerin etkisinden korurlar. Birçok klinik çalışmada enterococcal slime ile ilgili çalışma mevcutken, gıdalardan izole edilen *Enterococcus*'ların slime oluşumlarıyla ilgili çok az çalışma mevcuttur [157].

Çalışmamızda balıktan izole edilen 150 izolatın 102'si (%68) slime (+), 48'i(%32) slime (-)'dir (Çizelge 4.5). Tatlı su balıklarından izole edilen türlerin 56'sı(76,7) slime (+), 17'si(%23,3) slime (-)'dir(Çizelge 4.6). Deniz balıklarından izole edilen türlerde ise 47'si(%61) slime (+), 30'u(% 39) slime (-) olarak bulunmuştur(Çizelge 4.7).

Balık örneklerinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatinın jelatinaz oluşumlarına bakılmıştır (Çizelge 4.10). 150 *Enterococcus* izolatin, 19'u (%12,7) jelatinaz (+), 131'i (%87,3) jelatinaz (-)'dir. Tatlı su balıklarından izole edilen türlerin 15'i(%20,5) jelatinaz (+), 58'i(%79,5) jelatinaz (-)' dir (Çizelge 4.11). Deniz balıklarından izole edilen izolatların 4'ü(% 5,2) jelatinaz (+), 73'ü(% 94,8) jelatinaz (-) olarak tespit edilmiştir(Çizelge 4.12).

DNaz, DNA'yı parçalama kabiliyetinden dolayı *Enterococcus*'ların önemli virulans faktörleri arasında kabul edilmektedir.

Araştırmamızda elde edilen 150 izolattan 128'i (% 85,3) DNaz (+), 22'si (14,7)DNaz(-)'dir (Çizelge 4.13). Tatlı su balıklarından izole edilen 73 *Enterococcus* izolatinın 54'ü (% 74) DNaz (+), 19'u (%26) DNaz (-)'dir(Çizelge 4.14). Deniz balıklarından izole edilen 77 izolattan 74'ü(%96,1) DNaz (+), 3'ü (% 3,9) DNaz (-)'dir(Çizelge 4.15).

Hemolizinler enfeksiyonların oluşma riskini artırabilmeleri nedeniyle enterococcal virulansta önemli rol oynar. Az sayıdaki çalışma *Enterococcus* suşlarının hemolizin ürettiğini ve insan, at ve koyun eritrositlerine karşı aktif olduğunu göstermektedir [93,157].

Tatlı su balık örneklerinden izole edilen 73 izolatin 2'si(% 2,7) hemoliz (+), 71'i(% 97,3) hemoliz (-)'dir(Çizelge 4.17). Deniz balıklarından izole edilen 77 *Enterococcus* izolatinın 1'i(% 1,3) hemoliz (+), 76'sı(% 98,7) hemoliz (-) olarak tespit edilmiştir(Çizelge 4.18).

Araştırmamızdaki bu sonuçlar balıklardan izole edilen *Enterococcus*'ların, slime ve dnaz özellikleri izolatların çoğunda pozitif sonuç verirken jelatinaz ve hemoliz aktiviteleri çoğunlukta negatif olarak tespit edilmiştir.

Bazı çalışmalarda jelatinaz üretiminin sadece *E.faecalis*'e has bir özellik olduğu bildirilmesine karşın, Elsner ve ark., 2000, Eaton ve Gasson, 2001, yapmış oldukları çalışmada az sayıda *E.faecium* ve *E.hirae* suşunda bu özelliğe rastlamışlardır [99,180].

Eaton ve Gasson (2001), insan ve gıda orijinli *E.faecalis* suşlarında %56 oranında jelatinaz sıklığı saptamışlardır [99].

Bu çalışmalar jelatinaz özelliğinin klinik suşlarda yüksek oranda bulunduğunu ve hayvansal gıda orijinli suşlarda da bulunabileceğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda da balıklardan 6 *E.faecalis* izolatı elde edilmiş ve 4'ü(%66,7) jelatinaz (+), 2'si(%33,3) jelatinaz (-) olarak saptanması bu çalışmalara paralellik göstermiştir. Bunun dışında elde edilen diğer türlerinde pozitif sonuç vermeleri bu özelliğin sadece *E.faecalis*'e has bir özellik olmadığını göstermiştir.

Aynı araştırmacılar birçok yayında hemolizin üretiminin sadece *E.faecalis*'e has bir özellik olduğu bildirilmesine karşın yapmış oldukları çalışmada *E.faecium* suşlarında ve insan orijinli birer *E.hirae* ve *E.gallinarum* suşlarında bu özelliğe rastlamışlardır. Hemolizin üretimine, insan kökenli *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında, hayvansal orijinli suşlara göre (%33-%15,9) daha yüksek oranda rastlanmıştır. Elsner ve ark. (2000), bakteriyemik insanlardan izole edilen *E.faecalis* suşlarının (%16)'sının hemolizin ürettiğini saptamışlardır[180]. Eaton ve Gasson (2001), klinik örneklerde ve hayvansal gıdalarda yapmış oldukları çalışmada *E.faecalis*'in sırasıyla (%33)'ünü ve (%44)'ünü hemoliz (+) bulmuşlardır [99]. Bu sonuçlar bizim çalışmamızı desteklememektedir.

Oladipo ve ark.(2014), Nijeryada geleneksel fermente gıdalarla yapmış oldukları çalışmada *E. gallinarum* izolatlarının virulans potansiyellerini incelemişlerdir. Elde edilen 5 *E. gallinarum* izolatının hiçbirinde hemolizin ve jelatinaz üretimi saptanmamıştır.

Araştırmamızdaki sonuçlara göre, balıklarından elde edilen 20 *E. gallinarum* izolatının hiçbirinde hemolizin ve jelatinaz üretimi saptanmaması bu çalışmayla uyum göstermiştir [181].

Torlak(2013) gıda örneklerinden izole edilen 100 *Enterococcus* izolatının DNaz oluşumlarını incelemiş ve 100 *Enterococcus* izolatın, 6'sı (%6) DNaz (+), 94'ü (%94) DNaz (-) olarak saptamışlardır [182]. Bizim çalışmamızda ise 150 izolatın 128'i (% 85,3) DNaz (+), 22'si (14,7) DNaz (-) olarak bulunmuştur.

Biyofilm tek yönlü olarak bir substrata, ara yüzeye veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan, türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlanmıştır [120]. Biyofilmler gıda sektörü için sadece kontaminasyon kaynağı olmayı aynı zamanda işletme ekipmanlarında korozyon oranını artırır ve ısı transferini düşürür.

Biyofilm sadece gıda endüstrisinde değil aynı zamanda insane sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Sağlık Enstitüleri(The National Institutes of Health), enfeksiyonların % 80'inden fazlasına biyofilmlerin neden olduğunu tahmin etmektedir [183].

Araştırmamızda biyofilm ölçümü için mikrolatelerde biyofilm oluşumuna ve kongo kırmızılı agarda slime testine bakılmıştır. Çizelge 4.9'daki biyofilm sonuçları incelendiğinde tatlı su balıklarından izole edilen *Enterococcus* türlerinin 71'i (%97,3) pozitif sonuç verirken, TSB+% 2 glikoz da 24 saatlik inkubasyon sonucunda 73 izolatın 61'i (%83,6) pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir. Deniz balıklarından izole edilen 77 *Enterococcus* izolatının 37°C'de TSB da biyofilm oluşumları incelendiğinde 77'si(%100) pozitif sonuç vermiştir. Aynı izolatların TSB+% 2 glikoz da 24 saatlik inkubasyonu sonucu 75'i (%97,4) pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir.

Kıvanç ve ark (2013), diyabetik hastalarda enterokokların göz içi potansiyel virulanslarını göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada biyokimyasal testlerle elde edilen 26 enterokok kökeninin 24'ü *E.faecalis*, 2'si *E.avium* olarak tanımlamıştır.

İncelenen tüm *E. faecalis* kökenlerinin biyofilm ürettikleri saptanmıştır [184]. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Gündoğan ve ark (2013), et ve süt ürünlerinden *E. faecalis* ve *E. faecium* izole ettiği çalışmada toplam 125 izolatın 55'i(%44) *E. faecalis*, 30'u(%24) *E. faecium* olarak tanımlanmıştır [185]. İncelenen bu izolatların tümünde biyofilm oluşumu saptanmamıştır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermemiştir.

Araştırmamızda balık örneklerinden elde edilen 150 izolatın 102'si(%68) slime pozitif bulunurken, 48'i(%32) slime negatif olarak tespit edilmiştir.

Çiftçi ve ark(2009) yapmış oldukları çalışmada tavuklardan izole ettiği 67 *E.faecalis* izolatının 40'ı(%59,7) slime pozitif , 27'si (%40,3) slime negatif olarak bulmuştur [186]. Elde edilen sonuçlar çalışmamızı desteklemektedir.

Özellikle son yıllarda antibiyotik tüketiminin oldukça arttığı bilinmektedir. Antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarında yaygın kullanımı, bir tarafta tedavide başarı sağlarken, diğer tarafta enfeksiyona neden olan bakterilerde, kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde ve hızlı bir şekilde dirençliliğin gelişimine neden olmaktadır[187].

Çıtak ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada, çiğ sütte birden çok antibiyotiğe dirençli *Enterococcus* suşu izole etmişlerdir. Bu sonuçlar, *Enterococcus*'ların enfeksiyonların gizli kaynağı olabileceğini göstermiş olup, özellikle vankomisine dirençli *Enterococcus*'ların halk sağlığını ciddi şekilde tehdit ettiğini vurgulamışlardır [89].

Sonuçlarımıza göre; tatlı su balık örneklerinden elde edilen toplam 73 *Enterococcus* izolatının antibiyotik dirençlilikleri incelendiğinde, 68'i (%93,2) novobiosine, 61'i (%83,6) ampisiline, 41'i (%56,2) vankomisine, 40'ı (%54,8) tetrasikline, 26'sı (%35,6) siprofloksasine, 24'ü (%32,9) eritromisine, 21'i (%28,8) kloramfenikole, 18'i (%24,6) teikoplanine, 18'i (%24,7) nitrofurantoine ve 14'ü (%19,2) gentamisine dirençli olarak bulunmuştur.

Deniz balıklarından izole edilen 77 izolatın antibiyotik dirençlilikleri, 71'i (%92,2) ampisiline, 53'ü (%68,8) tetrasikline, 50'si (%64,9) eritromisine, 34'ü (%44,1) vankomisine, 34'ü (%44,1) novobiosine, 38'i (%49,3) siprofloksasine, 27'si (%35,1)

nitrofurantoin 24'ü (%31,2) kloramfenikole, 18'i (%24,6) teikoplanine, 16'sı (%20,8) gentamisine ve 3'ü (%3,9) teikoplanine dirençli olarak bulunmuştur.

Babar ve ark.(2014), Pakistan'da klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus*'ların vankomisin dirençliliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 190 *Enterococcus* izolatından 22'si(%11,57) vankomisine dirençli olarak bulunmuştur[188].Bizim çalışmamızda tatlı su balıklarından elde edilen 73 izolatın 41'i(%56,2) deniz balıklardan elde edilen 77 izolatın ise 34'ü(%44,1) vankomisine direnç göstermiştir.

Kasımoğlu ve ark. (2010), tavuk örnekleri ile yaptıkları çalışmada, izole edilen *Enterococcus* suşlarında eritromisin (%91), tetrasiklin (%98) ve kloramfenikol (%48) antibiyotiklerine karşı direnç saptamışlardır [178].

Gıda örneklerinde vankomisin direnci saptanmasının, halk sağlığını yüksek oranda tehdit edebileceğini belirtmişlerdir [178]. Vankomisine tetrasikline ve kloramfenikole direnç saptanması çalışmamızın sonuçlarını desteklemiştir.

Costa ve ark. (2010), tavuk örnekleriyle yaptıkları çalışmada 29 tavuk örneğinden izole ettikleri 17 (%59) *Enterococcus* izolatı vankomisine tespit etmişlerdir. Vankomisin dirençli tüm *E. faecium* izolatları tetrasiklin ve eritromisine karşı dirençli iken, ampisiline ve siprofloksasine karşı %50 dirençli bulmuşlardır [189]. Bu sonuçlar bizim çalışmamızı desteklememektedir.

Robredo ve ark. (2000), yaptığı bir çalışmada tavuklardan izole edilen *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecium* izolatları teikoplanin ve eritromisin direnci saptanarak çalışmamızın sonuçlarını desteklemiştir [71].

Çıtak ve ark.(2006), yapmış oldukları çalışmada çiğ süttten izole edilen *Enterococcus* suşlarında Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Okzasilin (%95), streptomisin (%97) ve eritromisin (%86) antibiyotiklerine yüksek düzeyde direnç saptanırken, vankomisin (%48) ve teikoplanin (%52) antibiyotiklerine orta düzeyde direnç saptanmıştır [190].

Gıdalardan izole edilen *Enterococcus*'ların vankomisin antibiyotiğine dirençli bulunmasının birçok enfeksiyona neden olabileceğini bildirmişlerdir [190].

Bizim çalışmamızda da beta laktam grubu antibiyotiklerden olan ampisiline ayrıca teikoplanin ve vankomisine direnç bulunması paralellik göstermektedir.

Kavukoğlu(2011) fermente et ürünleriyle yaptığı çalışmada elde edilen toplam 134 *Enterococcus* izolatının antibiyotik dirençliliklerini incelemiş ve 98'i(%73,1) rifampine, 49'u (%36,6)streptomisine, 27'si (%20,1) eritromisine, 20'si(%14,9) nitrofurontoine ,8'i(%6) siprofloksasine, 8'i (%6) tetrasikline, 3'ü(%2,2) gentamisine, 2'si(%1,5) kloramfenikole, 2'si(%1,5) teikoplanine, 1'i(% 0,7)penisiline ve 1'i(%0,7) ampisiline dirençli bulunmuş. Vankomisin dirençli izolat bulunmamıştır [191].

Bizim çalışmamızda tatlı su balıklarından izole edilen izolatların antibiyotik dirençliliği eritromisin ile paralellik gösterirken siprofloksasin, tetrasiklin ve ampisilin direnç değerleri daha yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda deniz ve tatlı su balıklarında vankomisine dirençli izolatlar tespit edilmiştir.

Gündoğan ve ark(2013), et ve süt ürünleriyle yaptıkları çalışmada toplam 125 izolatın 55'i *E. faecalis*, 30'u *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların antibiyotik dirençliliği incelendiğinde ampisilin, kloramfenikol, teikoplanin, tetrasiklin ve vankomisine duyarlı olarak bulunurken eritromisine (%47), gentamisine (%14) ve penisiline(%4) direnç göstermiştir [185]. Araştırmamızda tatlı su ve deniz balıklarında vankomisin, ampisilin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençli, gentamisine de duyarlı izolatların fazla olması bu çalışmayla uygunluk göstermemiştir.

Enterococcuslar'lar doğadaki geniş yayılımları, gram pozitif mikroorganizmalarda sık rastlanmayan yüksek sıklıkta genetik madde değişim kapasiteleri, buna bağlı olarak yüksek düzeyde antibiyotik dirençlilikleri ve neden oldukları enfeksiyonlardaki yüksek mortaliteleri ile ilgi çeken mikroorganizmalardır [192].

Enterococcus'ların insanlara bulaşmasında hayvanların rolü, ekzojen bulaşmanın anlaşılmasından ve hayvansal *Enterococcus* suşlarında da antibiyotik dirençliliğin artmasından sonra dikkati çekmiştir. Ayrıca dirençli *Enterococcuslar*'da hayvanların rolü olabileceği bazı araştırmalarda gösterilmiştir [156, 193].

Enterococcus suşlarının gıdalarda starter ve probiyotik kültür olarak kullanılması gıda güvenliği açısından çok iyi değerlendirilmelidir. Enfeksiyon yapan *Enterococcus* türlerinin gıdalarda bulunmaları istenmemektedir.

Hastalık yapan *Enterococcus* türleri ile gıdalarda bulunan *Enterococcus* türleri birbirleri ile ilişkilendirilmemesine rağmen, bu bakterilerin starter kültür ve/veya probiyotik kültür olarak, gıda zincirine girecek suşların seçilmesinde daha dikkatli olmayı gerektirmektedir. Günümüzde halen *Enterococcus* türlerinin starter kültür olarak kullanılmalarına cevap vermek güçtür.

Ekolojik olarak laktik asit bakterileri içinde yer alan *Enterococcus*'lar, insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde ve fermente edilmiş gıdalarda yer alırlar. Birçok fermente et çeşidinin tat ve aromasının oluşmasında önemli rol oynamaları, bakteriyosin üretme yetenekleri ve probiyotik olarak kullanılabilirlikleri gibi önemli teknolojik özelliklere sahip olmalarının yanı sıra, klinik enfeksiyonlarda etkili olmaları ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç nedeniyle gıda kaynaklı patojenler olarak görülebilmektedirler. *Enterococcus*'lar peynir ve diğer fermente ürünlerinde starter kültür veya probiyotik olarak kullanılabilmesi için bu patojenliğe yol açan tüm faktörlerin detaylıca araştırılması gereklidir. Böylece diğer laktik asit bakterileri gibi gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılması sağlanabilir [194].

Enterococcus cinsi içinde probiyotik özellik gösteren iki tür *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* olarak bildirilmiştir.

Enterococcus faecium'un insanlarda diyarenin tedavisinde probiyotik olarak kullanımının, antibiyotik uygulamalarına bir alternatif olabileceği düşünülmektedir [63, 106, 195].

Çalışmamızda balık örneklerinden izole edilen 150 izolatın 4°C'deki proteolitik enzim aktiviteleri incelendiğinde 73'ü (%48,7) orta derecede pozitif, 20°C'deki proteolitik enzim aktivitesi 102'si(%68) negatif, 37°C'deki proteolitik enzim aktivitesi ise 42'si(%28) kuvvetli pozitif ve 42'si(%28) orta derecede pozitif olarak bulunmuştur(Çizelge 4.17, 4.18, 4.19). Lipolitik enzim aktiviteside incelenmiş fakat pozitif sonuç bulunamamıştır.

Çıtak ve ark.(2005), çiğ süt ve beyaz peynir ile yapmış olduğu çalışmada izole edilen *Enterococcus* suşlarında 7°C’de ve 25 °C’de proteolitik enzim aktiviteleri yüksek düzeyde saptanırken, 30°C’de lipolitik enzim aktivitesi daha düşük oranda saptanmıştır [89]. Bizim çalışmamızda da proteolitik enzim aktiviteleri daha yüksek görüldüğünden paralellik gözlenmektedir.

Tuncer (2009), yapmış olduğu bir çalışmada tulum peynirinden izole edilen 39 *Enterococcus* izolatında en yüksek proteolitik enzim aktivitesi *E. faecalis* suşunda pozitif olarak saptanırken, onun ardından *E. faecium* ve *E. durans* suşlarında düşük oranda saptanması sonuçlarımızı desteklerken *E. faecalis* suşunda daha düşük oranda pozitiflik tespit edilmiştir [159].

Karabıyık(2011) fermente et örnekleriyle yaptığı çalışmada 134 *Enterococcus* izolatının 18’inde (%13.4) 7°C’deki proteolitik enzim aktivitesi, 2’sinde (%1.5) 25°C’de proteolitik enzim aktivitesi, 112’sinde (%83.5) lipolitik enzim aktivitesi pozitif olarak saptanmıştır [41]. Araştırmamızdaki proteolitik aktivite sonuçlarıyla paralellik gösterirken, yüksek oranda lipolitik aktivite gözlenmesi çalışmamıza uygunluk göstermemiştir.

Gündoğan ve ark(2013) Gündoğan ve ark (2013), et ve süt ürünlerinden *E. faecalis* ve *E. faecium* izole ettiği çalışmada toplam 125 izolatın 55’i(%44) *E. faecalis*, 30’u(%24) *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatların 20°C’de 10 günlük inkübasyonu sonucu proteolitik aktivitelerine bakıldığında 55 *E. faecalis* izolatının 9’u(%16), 30 *E. faecium* izolatının 2’si(% 6) pozitif sonuç verirken, lipolitik aktivitelerinde pozitiflik saptanmamıştır. Bu çalışma araştırmamızdaki lipolitik aktivite sonuçlarını desteklerken, proteolitik aktivite sonuçlarıyla uygunluk göstermemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre insanların en önemli besin kaynağını oluşturan balıkların florasında birçok *Enterococcus* türüne rastlanmıştır. Balıklardaki bu tür bakterilerin bulunması suyun mikrobiyolojik kalitesi hakkında değerlendirme yapabilmekte ve balıkların bakteriyel florasının yaşadıkları su ortamının mikroflorasını yansıttığını desteklemektedir. Özellikle *Enterococcus* üyelerinin sulardaki varlığı bir kontaminasyona işaret olduğu vurgulanmaktadır. Araştırmamız kapsamında toplanan balık örneklerinde *Enterococcus* üyelerinin baskın olarak bulunması çalışılan balık örneklerinin kirli sulardan avlanıldığını düşündürmüş, balık marketlerinde hijyen kurallarına uyulması gerekliliğini göstermiş ve halk sağlığı açısından riskli olduğu kanısını ortaya çıkarmıştır.

Araştırmamızda *Enterococcus* türlerinde patojeniteyi belirleyen çeşitli virülans faktörlerinin belirlenmesi bu bakteriler ile oluşabilecek enfeksiyonların şiddeti, mücadelesi ve konak-patojen ilişkisi hakkında bilgi vermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ve elde ettiğimiz bulgulara göre beslenmede önemli bir yere sahip olan balık florasındaki bakterilerin antibiyotik direncinin yüksek oranda çıkması aşırı ve yanlış antibiyotik kullanımının sonucu olarak gösterilebilir. Bunun yanı sıra sucul ortamlarda uygun transformasyonların oluşması antibiyotik direncinin bakteriler arasında yayılma ihtimalini de artırabilmektedir. Antibiyotiklere dirençli olan bu bakteriler insanların önemli bir besin kaynağı olan balıkların tüketilmesi ile insanlara geçebilmektedir, bu durum önemli bakteriyel enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır.

Çalışmamızda balıklardan izole edilen *Enterococcus* izolatlarında çoklu antibiyotik direncinin bulunması gıda endüstrisinde de çoklu antibiyotik direncine dikkat edilmesini ortaya koymuştur. Çünkü çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilerin gıdalarla beraber tüketilmesi halk sağlığı için risk teşkil edebilir. Bu nedenle *Enterococcus* kökenli hastalıkların doğru tedavi politikalarının oluşturulabilmesi ve antibiyotik direncinin artmasını engellemek amacıyla uygun antibiyotik kullanımının yaygınlaştırılması ve etkili tedbirlerin alınması önemlidir.

Gıdalar üzerinde gelişen bazı mikroorganizmalar proteinleri hidrolize ederek tadında ve kokusunda olumsuz etkiye neden olabilirler. Özellikle depolama süresi boyunca bu

mikroorganizmalar çoğalarak gıdaları tüketemeyecek duruma getirmektedir. Süt, et, kanatlı et ve deniz ürünlerinde proteolitik bakteri sayımları kalite kayıplarının belirlenmesinde önemli bir mikrobiyel kriterdir. Araştırmamızda balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinde proteolitik aktivite gözlenirken, kalite faktörü olarak değerlendirilen lipolitik aktivite gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

1. WHO (World Health Organization), (1997). *Food safety and foodborne diseases*. World Health Statistics Quarterly, 50.
2. MMWR, (2000). Anonim: Preliminary Foodnet Data on The Incidence of Foodborne Illness-Selected Sites, United States,50(13).
3. İnternet:URL:http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.tuik.gov.tr%2F+VeriBilgi.do%3Falt_id%3D6.+&date=2015-06-20 Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
4. Alpaz, A. (2005). *Su Ürünleri Yetiştiriciliği*, Alp Yayınları, İzmir, 576.
5. Varlık, C., Erkan, N., Özden, Ö., Mol, S. ve Baygar, T. (2004). *Su Ürünleri İşleme Teknolojisi*. 7. Baskı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul.
6. Terzi, G. (2006). Ankara ili'ndeki bazı gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerine ait su, yem ve balıkların mikrobiyolojik yönden incelenmesi. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 32(1), 37- 46.
7. Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical*, Rome, 348.
8. Munro, A.L.S. (1982). The pathogenesis of bacterial diseases of fish., R.J. Roberts (Ed.), *Microbial Disease of Fish*. London: Academic Press, 131-149.
9. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (2003).Fish disease and disorders: *Viral, bacterial and fungal infections*. Oxfordshire: CABI Publishing, 3.
10. Patır, A., Dinçoğlu, A.H. ve İnanlı, A.G. (2002). Keban Baraj Gölü tatlı su istakozlarının (*Astacus leptodactylus*) mikrobiyolojik kalitesi ile mikrobiyal florası üzerine araştırmalar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, (19), 19-28.
11. İnal, T.(1992). *Besin Hijyeni Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü*. İstanbul, Final Ofset.
12. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fhttp%3A%2F%2Fsazan.blogcu.com%2Fsazan-baligini-taniyalim%2F4483941.&date=2015-06-20> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
13. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.dardenia.com%2Fblog%2Fk%25C3%25BClt%25C3%25BCr-sanat%2FDardenia-ayisigi.+&date=2015-06-20> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
14. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.baliksevdam.com&date> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
15. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.notdenizi.com%2Fbalik-cesitleri-ve-ozellikleri-1435&date> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.

16. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2FURL%3Ahttp%3A%2F%2Fdatcabalikavi.blogspot.com.tr%2F2013%2F10%2F06102013-kum-mezgiticipura-avvolume-2.html&date=2015-06-20> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
17. İnternet:URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2FURL%3Ahttp%3A%2F%2Fwww.alasayvan.com%2Fbalik-ve-akvaryum%2F113652-palamut-baligi-resimleri.html&date=2015-06-20> Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
18. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.balikavi.net%2Fforum%2Fshowthread.php%3Ft%3D37845&date=2015-06-20>. Son Erişim Tarihi: 20.06.2015.
19. Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M. and Bercovier, H.(1996). *Enterococcus seriocilida* is junior synonym of *Lactococcus garviae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiology*, (32),85-88.
20. Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. *Applied Environmental Microbiology*, (65), 1005-1008.
21. Cheng, W. and Chen, J.C.(1998). Isolation and characterization of an *Enterococcus* like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan. *Dis Aquat Organ*, (34), 93-101.
22. Romalde, J. L., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J.L. and Toranzo, A.E.(1996). Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Applied Environmental Microbiology*,(62), 607-611.
23. Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M., E.(1999). *Enterococci* at the crossroad of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, (47), 1-24.
24. Oryaşın, E. (2008). “Çeşitli Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Enterokokların Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti”, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 75-81.
25. Linden, P.K. and Miller, C.B. (1999). Vancomycin-resistant *Enterococci*: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, (33), 113– 120.
26. Knudtson, L.M. and Hartman, P.A. (1992). “Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci”, *Applied and Environmental Microbiology*, (56), 3027-3031.
27. Leclerg, R. and Courvalin, P. (1996). Emerging problems with enterococcal infections. *Current Opinion Infectious Diseases*, (9), 115- 119.
28. Bager, F., Madsen, M., Christensen, J. and Aarestrup, F. M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prevent Veterinary Medicine* (31), 95- 112.

29. Rodrigues, J., Poeta, P., Martin, S.A. and Costa, M.D. (2002). The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains with special reference to vancomycin. *Journal Veterinary Medicine*, (49), 278- 280.
30. Dilik, Z. (2008). *Entansif Broyler İşletmeleri İle Kırsal Tavukçuluk İşletmelerinden İzole Edilen Enterokolların Fenotipik ve Genotipik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar*. Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 85.
31. Egemen, Ö. *Çevre ve Su Kirliliği*. İzmir, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No: 42,1999.
32. Arslan, A. *Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi*. Elazığ, Medipress, 2002.
33. Gorga, C. and Ronsivalli, L.J. (1988). *Quality surance of seafood*. NewYork: Van Nostrand Reinhold Company.
34. Liston, J. (1990). Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technology*, 44(12), 56, 58-62.
35. Toranzo, A.E., Combarro, P., Conde, Y. and Barja. J.L. (1985). Bacteria: isolated from rainbow trout reared in fresh water in Galicia (Northwestern Spain); taxonomic analysis and drug resistance patterns., E.Ellis Anthony (Ed.), *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, 141-152.
36. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1988). *Food Microbiology*, Singapore: McGrew-Hill Book Co. 289-397.
37. Jay, J.M. (1992). *Modern Food Microbiology*. NewYork: Chapman and Hall.
38. Todd, E.C.D. (1978). Foodborne disease in six countries a comparison. *Journal Of Food Protection*, 41, 559-565.
39. Ringo, E., Jutfelt, F., Kanapathippillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T.M., Myklebust, R. and Olsen, R.E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) .*Cell and Tissue Research*, 318, 305-311.
40. Göktan, D., (1990). *Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi*, cilt 1, Et Mikrobiyolojisi, Ege Üniv. Basımevi, Mühendislik Fakültesi Yayınları, No:21, İzmir, 61-66.
41. Karabıyık, Z. (2011). *Fermente Et Örneklerinden İzole Edilen Enterococcus Türlerinin Bazı Teknolojik Özellikleri ve Çoklu Antibiyotik Dirençliliği*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 85-90.
42. Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3,45-46.
43. Scheleifer, K.H., Kilpper-Balz., R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Sysematic Bacteriology*, 3, 31-34.

44. Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *Enterococci* from food and gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 2-3, 123-131.
45. Halkman, K. (2000). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, *Sim Matbaası*, Ankara, 17, 522.
46. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (1998). *Gıda Mikrobiyolojisi*. Ege Üniversitesi, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı, İzmir, 263-289.
47. Riboldi, G.P., Frazzon, J., Azevedo, P. and Frazzon, A. (2009). Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, (40), 125-128.
48. Metin, M. ve Öztürk, F.G. (2003). *Süt işletmelerinde sanitasyon*. E.Ü. Mes. Yük. Okulu Yay. No:17, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
49. Komprda, T., Sládková, P., Petirová, E., Dohnal, V. and Burdychová, R. (2010). Tyrosine and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and *Enterococci* in dry fermented sausages. *Meat Science*, 86(3), 870-877.
50. Karataş, A. (2005). *Beyaz peynir ve fermente sucuklardan Enterococcus faecium'un izolasyonu ve tanımlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 67-71.
51. Barbosa, J., Ferreira, V. and Teixeira, P. (2009). Antibiotic susceptibility of *Enterococci* isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*, (26), 527-532.
52. Saymer, H.S. (2008). *Antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalıklarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Ok Meydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 87-92.
53. Ortigosa, M., Irigoyen, A., Urdin, A., Garcia, S., Ibanez, F.C. and Torre, P. (2008). Sources of *Enterococci* in Idiazábal-type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, (125), 146-152.
54. Novakova, I., Kacaniova, M., Arpasova, H., Hascik, P., Kunova, S. and Cubon, J. (2010). Antibiotic resistance of *Enterococci* and coliform bacteria in dairy products from commercial farms. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 307-309.
55. Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. and Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, (21), 462-470.
56. Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Faretti, F., Orefici, G. and Di Rosa, R. (2004). Survey of virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, (53), 13-20.

57. Fisher, K. and Philips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology Reviews*, 155,1749–1757.
58. Çıtak, S., Gündoğan ve N., Kala, E. (2010). Ankara ilinde dondurulmuş et ve sebzelerde koliform ve *Enterokok*’ların fekal indikatör bakteri olarak değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(4), 145-151.
59. Teixeira, L.M., Carvalho, M.G.S. and Facklam, R.R. (2009). *Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık*, Ankara, (1), 430-438.
60. Schlegelova, J., Babak, V., Holasova, M., Tantinova, L.K., Necidova, L., Sisak, F., Vlkova, H., Roubal, P. and Jaglic, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(5), 450–461.
61. Sanchez, J., Basanta, A., Gomez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernandez, P.E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic *Enterococci* isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *International Journal of Food Microbiology*, (117), 295–305.
62. Giraffa, G. (2003). Functionality of *Enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.
63. Hugas, M., Garigga, M. and Aymerich, M.T. (2003). Functionality of *Enterococci* in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 223-233.
64. Arizcun, C., Barcina, Y. and Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecium* spp. isolated from milk and roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, (38),17-24.
65. Giraffa, G., Carminati, D. and Neviana, E. (1997). *Enterococci* isolated from dairy products: a rewiev of risk and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60(6),732-737.
66. Giraffa, G. (2002). *Enterococci* From Food. *FEMS Microbiology Reviews*, (26), 163-171.
67. Guessas, B. and Kihal, M. (2004). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from algerian arid zone raw goat’s milk. *African Journal of Biotechnology*, 3(6),339-342.
68. Semedo, T. Santos, M.A. Lopes, M.S. and Ma Rques, J.J. (2003). Virulance factors in food, clinical and reference *Enterococci*: a common trait in the genus. *System Applied Microbiology*, (26),13-22.
69. Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999). *Enterococci* at the crossroad of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24 (1999).
70. Barakat, R.K., Griffiths, M.W. and Harris, L.J. (2000). Isolation and characterisation of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified

- atmosphere packed, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, (62), 83-94.
71. Robredo, B., Singh, K.V., Baquero, F., Murray, B.E. and Torres, C. (2000). Vancomycin resistant *Enterococci* isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology*, (54), 197-204.
 72. Papamanoli, E., Tzanestakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. (2003). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from a greek dry-sausages in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867.
 73. Sümerkan, B. (2002). *Vankomisine dirençli Enterococcus*'lar. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 10(2),1-5.
 74. Strompfova, V., Laukova, A., Simonova, M. and Marcinakova, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in *Enterococci* of different origin. *Veterinary Microbiology*, 132, 293–301.
 75. İnat, G. (2008). Pastırma üretiminde kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve iyileştirme koşullarının araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(1-2):53-59.
 76. Ogier, J. and Serror, P. (2008). Safety assesment of diary microorganisms : The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
 77. Keeratipibul, S., Techaruwichit, P. and Chaturongkasumrit, Y. (2009). Contamination sources of coliforms in two different types of frozen ready-to-eat shrimps. *Food Control*, 20, 289-93.
 78. Korenova, J., Lopasovska, J. and Kuchta, T. (2009). Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewes milk and meat processing enterprises in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 48(3), 115-125.
 79. Kinley, B., Rieck, J., Dawson, P. and Jiang, X. (2010). Analysis of *Salmonella* and *Enterococci* isolated from rendered animal products. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(1), 65-73(9).
 80. Turtura, G.C. and Lorenzelli, P. (1994). Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiology Research.*, 149, 203-213.
 81. Devriese L.A., Pot, B., Van Dame, L., Kersters, K. and Haesbrouck, F. (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 187-97.
 82. Wegener, H.C., Madsen, M., Nielsen, N. and Aarestrup, F.M. (1997). Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 57-66.
 83. Pavia, M., Carmello, G.A., Salpietro, L. and Angelillo, I.F. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of *Enterococci* in raw meat. *Journal of Food Protection*, 63(7), 912-915.

84. Hayes, J.R., English, L.L., Carter, P.J., Proescholdt, T., Lee, K.Y., Wagner, D.D. and White, D.G. (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7153-7160.
85. Bodil, L. (2003). Different roles of *Enterococcus faecium* from a human perspective. *Doktorsavhandling Vid Karolinska Institutet*, 3, 435.
86. Peters, J., Mac, K., Wichmann-schauer, H., Klein, G. and Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 311-314.
87. Fifadara, N., Radu, S., Hassan, Z., Beuchat, L.R. and Rusul, G. (2003). Hemolytic and nonhemolytic vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from beef imported to Malaysia. *Journal of Food Protection*, 66(10), 1845-1850.
88. Sustackova, A., Napravnikova, E. and Schlegelova, J. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiology*, 49(4), 411-417.
89. Çıtak, S., Mendi, A. and Orhan, S. (2005). Incidence, antibiotic resistance and some technological properties of *Enterococcus* species isolated from raw milk and white cheese samples. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 56(4), 73-96.
90. Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. and Aymerich, M.T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of *Enterococci* from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1177-1190.
91. Moreno, F., Sarantinopoulos, M.R., Tsakalidou, P. and De, Vuyst, L. (2006). The role and application of *Enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
92. Nes, I.F., Diep, D.B. and Holo, H. (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *The Journal of Bacteriology*, 189, 1189-1198.
93. Gomes, B., Esteves, C., Palazzo, I., Darini, A., Felis, G., Sechi, L., Franco, B. And Martinis, E. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25, 668-675.
94. Valenzuela, A., Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R., Veljovic, K., Canamero, M., Topisirovic, M. and Galvez, A. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance and bacteriocins in *Enterococci* from artisan food of animal origin. *Food Control*, 20, 381-385.
95. Fontana, C., Gazzola, S., Cocconcelli, P.S. and Vignolo, G. (2009). Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 49(3), 411-414.

96. Quednau, M., Ahrne, S., Petesson, A.C. and Molin, G. (1998). Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *Journal of Applied Microbiology*, 84,1163-1170.
97. Kaleli, D. ve Özkaya, D.F. (2000). Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, *Enterokok* aranması. *Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği, Biyoloji Bölümü*, Ankara, 387.
98. Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Poulsen, R.L. and Westh, H. (1999). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed field gel electrophoresis patterns containing similar Tn-1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43,724-729.
99. Eaton, T.J. and Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchance between food and medical isolated. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(4),1628-1635.
100. Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H., Siezen, R.J., Hatter, K.L. and Gilmore, M.S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology*, 21(6),1175-1184.
101. Veljovic, K., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., Abriouel, H., Galvez, A. and Topisirovic, L. (2009). Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of *Enterococci* isolated from fermented products. *European Food Research and Technology*, 230,63–70.
102. Terzic-Vidojevic, A., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Ostojic, M. and Topisirovic, L. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated fromartisanal Zlata cheeses produced at two different geographical location. *Doaj Directory of Open Acces Journal*, 41(1),117-136.
103. Casaburi, A., Monaco, R.D., Cavella, S.S., Toldra, F., Ercolini, D. and Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory trait. *Food Microbiology*, 25,335– 347.
104. El-din, B., El-Soda, M. and Ezzat, N. (2002). Proteolitic, Lipolytic and Autolytic Activities of *Enterococci* strains isolated from Egyptian dairy products. *Lait*, 82,289-304.
105. Hayaloğlu, A. ve Enginkaya, Z. (2001). Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri , *Bizim Büro Basımevi*, 26 .
106. Enginkaya, Z., Yurdakul, N.E. ve Karakaş, A. (2007). *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in starter ve probiyotik kültür özellikleri. *Gıda Teknolojileri Derneği*, 32(3),137-142.
107. Göncüoğlu, M., Ormancı, F.S. ve Doğru, A. (2009). Beyaz peynir üretiminde *Enterococcus faecium*'un starter kültür olarak kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56,249-254.

108. Martin, B., Corominas, L., Garriga, M. and Aymerich, T. (2009). Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1),66-77.
109. Siminova, M., Sırotek, K., Marounek, M. and Laukova, A. (2008). Lipolytic activity of potential probiotic *Enterococci* and additive *Staphylococci*. *Acta Veterinaria Brno*, 77,575-580.
110. Linaje, R., Coloma, M.D., Perez-Martinez, G. and Zuniga, M. (2004). Characterization of faecal *Enterococci* from rabbits for the selection of probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 96,761-771.
111. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristic of Greek feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76,93-105.
112. Barbosa, J., Gibbs, P.A. and Teixeira, P. (2010). Virulence factors among *Enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5),651-656.
113. Kocazeybek, B., Çakan, H., Ayyıldız, A., Küçükateş, E., Gülsoy, Ö. ve Ordu, A. (2001). Cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen koagülaz negatif *Staphylococ*'larda slime faktörü oluşturma ve bunların kemoterapötiklere dirençlere ilişkisinin araştırılması. *Ankem Dergisi*, 15,4 683-689.
114. Kalkancı, A., Çırak Yalınay, M., Mansuroğlu, H. ve Kuştımur, S. (1999). *Candida* türlerinde slime faktör belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 29,183-5.
115. Cengiz, A.T. (1999). *Staphylococcus*., Ş. Ustaçelebi (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 339-347.
116. Orhon, H., Özbakkaloğlu, B., Sürücüoğlu, S., Tünger, Ö. ve Arısoy, A.S. (1998). Enfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 28,103-6.
117. Karaca, N., Koç, A.N. ve Karagöz, S. (2001). Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slime aktiviteleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 31,224-6.
118. Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Science American Journal*, 238,86-95.
119. Costerton, J.W., Lewandawski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews Microbiology*, 49,711-45.
120. Donlan, R.M. (2002). Biofilm: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Disease*, 8, 881-90.
121. Jones, H.C., Roth, I.L. and Saunders, W.M. (1969). III. Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99,316- 25.

122. Altun, H.U. ve Şener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
123. Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Steawart, P.S. and O' Toole, G.A. (2013). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426,306-10.
124. Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J.W. and Stoodley, A.P. (2002). Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immunology*, 70, 6339-45.
125. Mooler, S., Pedersen, A.R., Poulsen, L.K., Arvin, E. and Molin, S. (1996). Activity and three dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in multispecies biofilm assessed quantitative insituhybridization and scanning confocal laser microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, 62,4632-40.
126. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998). The involvement off cell-to-cell signals in development of bacterial biofilm. *Science*, 280,295-8.
127. Williams, P. (2006). Quorum sensing. *International Journal Medical Microbiology*, 296, 57-9.
128. Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-73.
129. Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2),41-46.
130. Rizzotti, L., La, Gioia, F., Dellaglio, F. and Torriani, S. (2009). Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on Tn916–1545 family transposons, in *Enterococci* from a total food chain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96,43–52.
131. Menteş, G.Ö. (2007). Yoğun bakım, onkoloji, hemotoloji hastalarında gastrointestinal sistemde kolonize olan *Enterococcus* türleri ve vankomisine dirençli profiller. *Uzmanlık Tezi*, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep, 120.
132. Frazzon, A.P.G. Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A. and Frazzon, J. (2010). Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26,365–370.
133. Weaver, K.E., Kwong, S.M., Firth, N. And Francia, M.V. (2009). The RepA N replicons of Gram-positive bacteria: a family of broadly distributed but narrow host range plasmids. *Plasmid*, 61(2),94–109.
134. Channaiah, L.H., Subramanyam, B., McKinney, L.J. and Zurek, L.(2010). Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent *Enterococci*. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(2),464-471.

135. Radhouani, H., Poeta, P., Pinto, L., Miranda, J., Coelho, C., Carvalho, C., Rodrigues, J., Lopez, M., Torres, C., Vitorino, R., Domingues, P. and Igrejas, G. (2010). Proteomic characterization of vanA-containing *Enterococcus* recovered from Seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W. Portugal. *Proteome Science*, 8, 48.
136. Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M. (1999). Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3497-3503.
137. Lu, H.Z., Weng, X.H., Li, H., Yin, Y.K., Pang, M.Y. and Tang, Y.W. (2002). *Enterococcus faecium* related outbreak with Molecular Evidence Transmission from pigs to humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 913-917.
138. Hammes, W.P. and Hertel, C. (2001). Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook food research. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 165-170.
139. Erdem, İ., Çiçek-Şentürk, G., Yücesoy-Dede, B., Yükselkoçoğlu, F., Yüksel ve S., Karagül, E. (2004). In vitro effect of levofloxacin and vancomycin combination against aminoglycosid resistant *Enterococci*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 92-94.
140. Lukasova, J. and Sustackova, A. (2003). *Enterococci* and antibiotic resistance. *Acta Veterinaria. Brno*, 72, 315-323.
141. Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: A risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. *Veterinary Microbiology*, 92, 111-119.
142. Durlu-Özkaya, F. and Tunail, N. (2005). Salamura beyaz peynirlerde Biyojen Amin riski. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2), 127-134.
143. Yerlikaya, P. ve Gökoğlu, N. (2002). Gıdalarda Biyojen Aminler ve önemi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 12(6), 24-30.
144. Meriç, M., Rüzgar, M., Günde, S. ve Willke, A. (2004). Hastanede yatan hastalardan izole edilen *Enterokok* türleri ve antibiyotiklere direnç durumu. *ANKEM dergisi*, 18(3), 141-144.
145. Butaye, P., Devriese, L.A. and Haesebrouck, F. (1999). Phenotypic distinction in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains between susceptibility and resistance to Growth-Enhancing antibiotics, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(10), 2569-2570.
146. Emborg, H.D., Andersen, J.S., Seyfarth, A.M., Boel, J. and Weneger, H.C. (2003). Relations between the occurrence of resistance to antimicrobial growth promoters among *Enterococcus faecium* isolated from broilers and broiler meat. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 273-284.

147. Başustaoglu, A., Aydoğan, H., Beyan, C., Yalçın, A. ve Ünal, S. (2001). First Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1),1-3.
148. Salminen, S., Wright, A.V., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Matilla-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44,93-106.
149. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M. and Swings, J. (2003). Effect of Raw-Milk cheese consumption on the *Enterococcal* flora of human feces. *Journal Applied and Enviromental Microbiology*, 69(1),312-319.
150. De, Vuyst, L., Moreno, M.R. and Revets, H. (2003). Screening for *Enterococci* and Detection of hemolysin and vancomycin resistance in *Enterococci* of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84,299-318.
151. Lemcke, R. and Bulte, M. (2000). Occurrence of the vankomisin resistant genes Van A, VanB, Van C1, Van C2 and Van C3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *International Journal of Food Microbiology*, 60 (2-3), 185-194.
152. Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D. and Werner, G. (2003). Witte W Occurrence and spread of antibiotic resistancesin *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88,269-290.
153. Giraffa, G., Olivari, A. and Nevianie, M. (2000). Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from Italian Cheeses. *Food Microbiology*, 17,671-677.
154. Namdari, H. (1998). Application of PCR for the characterisation of *Enterococci*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 20(11),91-93.
155. Yaman, F. ve Esendal, Ö. (2004). Balıklarda Probiyotik Kullanımı, *Orlab on-line. Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(6),1-18.
156. Quednau, M., Ahrne, S. and Molin, G. (1999). Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction Endonuclease Analysis Of Total Chorosomal DNA using EcorI and PruII. *Applied and Environmental Microbiology*, 1777-1780.
157. Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N., Vancanneyt, M., Swings, J. and Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulance factors and antibiotic resistace among *Enterococci* isolated from food. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(9),4385- 4389.
158. Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Leveidiotou, S. and Papadopoulou, C.(2010). Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1),1-5.
159. Tuncer, Y. (2009). Some technological properties of phenotypically identified *Enterococci* strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8(24),7008-7009.

160. Can, Y. ve Çelik, H. (2008). Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 79(4), 35-40.
161. Çıtak, S., Yücel, N. ve Orhan, S. (2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 27-31.
162. Schroeder, C.M., White, D.G. and Meng, J. (2004). Retail meat and poultry as araservoir of antimicrobial resistant *Enterococci*. *Food Microbiology*, 21, 249-255.
163. Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D. and Gazzola, S. (2003). Gene Transfer of Vancomycin and Tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 315-323.
164. Wilson, I.G. and McAfee, G.G. (2002). Vancomycin resistant *Enterococci* in shellfish, unchlorinated waters and chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 79(3), 143-151.
165. Chen, H.Y., Hill, R. and Kirk, M. (2002). Differential antimicrobial susceptibility between human and chicken isolates of vankomisin resistant and sensitive *E. faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(1), 39-46.
166. Devriese, L.A., Ieven, M., Gossens, H., Van, Damme, P., Pot, B., Hammez, J. and Haesebrouck, F. (1996). Presence of vancomycin resistant *Enterococci* in farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2285-2287.
167. Teuber, M., Pereten, V. and Wirsching, F. (1996). Antibioikum resistente Bakterien: enine neue dimension in in der lebensmittel microbiology. *Lebens-technology*, 29, 182-199.
168. Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewsski, E. and Van Nguyen, T. (2001). Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*, *Methods in Enzymology*, 336, 177-95.
169. Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E. and Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*, 23, 4233-4239.
170. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphyococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-9.
171. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37, 318-26.
172. Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Ventura, G.B., Djukic, S., Irkovic, I.C. and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter platesi overview of testing conditions and practical recommendations for asesment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*, 115, 891-9.

173. CLSI, (2009). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
174. Çıtak, S., Gündoğan, N. ve Kala, E. (2009). Ankara ilinde dondurulmuş et ve sebzelerde koliform ve Enterokokların fekal indikatör bakteri olarak değerlendirilmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(4),145-151.
175. Tansuphasin, U., Khaminthakul, D. and Pandii, W. (2006). Antibiotic resistance of *Enterococci* isolated from frozen foods and environmental water. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 37(1),162-70.
176. Macovei, L. and Zurek, L. (2006). Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of *Enterococci* from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6),4028-4035.
177. Svec, P. and Sedlack, I., (1999). Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiology*, 44(1),3-10.
178. Kasımoğlu, A., Gencay, E. ve Ayaz, D. (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of vanA and vanB genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Research in Veterinary Science*,89(2),153-158.
179. Hammad, A.M., Hassan, H.A. and Shimamoto, T.(2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. In Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, 50,815-820.
180. Elsner, H,A. and Sobottkal, I.(2000). Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical. Microbiology Infectious Diseases*, 19,39-42.
181. Oladipo, I.C., Swarnakar, S. and Sanni, A., (2014). Virulence potential of *Enterococcus gallinarum* strains isolated from selected Nigerian traditional fermented foods. *Journal BioScience Biotechnology*, 3(2), 97-104.
182. Torlak, Ö.F. (2013). *Klinik ve Gıda Örneklerinden İzole Edilen Enterokokların'ların Virulans Faktörleri ve Antibiyotik Dirençlilikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 77-84.
183. Çiftçi, Z. (2005). *Kronik tonsillitte biofilmin rolü*. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, Baskıda.
184. Kıvanç, S., Kıvanç, M. ve Güllülü, G. (2013). Türkiye klinikleri. *Journal Medicine Science*, 33(1),67-72.
185. Gündoğan, N., Ataoğlu, Ö. ve Torlak, Ö.F. (2013). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from meat and milk products. *Journal of Food Safety*, 33, 387-393.
186. Çiftçi, A., Fındık, A., İça, T., Bas, B., Onuk, E.E. ve Güngördü, S. (2009). *Veterinary Medicine Science*, 71(6), 849-853.

187. Altuğ, G., Yardımcı, H.C. ve İçöz, I.O. (2005). Haliç yüzey sularında *Enterobacteriaceae* üyelerinin bazı beta-laktam antibiyotiklerine dirençlilik frekansı. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3(4),258-264.
188. Babar, N., Usman, J., Munir, T., Gill, M.M., Anjum, R., Latif, G. and Latif, M. (2014). Frequency and antibiogram of vankomycin resistant *Enterococcus* in a Tertiary Care Hospital. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 24(1),27-29.
189. Costa, L., Radhouani, H., Gomes, C., Igrejas, G. and Poeta, P. (2010). High prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases *Escherichia coli* and vankomisin resistant *Enterococci* isolates from chicken products, a problem of public health. *Journal of Food Safety*, 30,141-153.
190. Çıtak, S., Gündoğan, N., Mendi, A. ve Orhan, S. (2006). Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw milk samples in Turkey. *Milchwissenschaft*, 61(2),150-152.
191. Kavukoğlu, B.M. (2011). *Hayvansal Kaynaklı Bazı Gram Pozitif Bakterilerdeki Beta Laktamaz ve Beta Laktam Dirençliliğinin Saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 84-87.
192. Çelik, S. (2001). Hayvan kökenli *Enterococcus* suşlarının virülans faktörleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara 75.
193. Pantosti, A., DelGrosso, M., Tagliabue, S., Nacri, A. and Caprioli, A. (1999). Decreased of vancomycin- resistant *Enterococci* in poultry meat after avoparcin ban. *Lancet*, 354,741-742.
194. Dağdemir, E. ve Özdemir, S. (2006). Süt ve Mamüllerinde *Enterococcus* 'lar. *Türkiye 9. Gıda Kongre Kitabı*, Bolu, 92.
195. Leroy, F., Moreno, M., R., F. and De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, An Interesting Bacteriocin Producer to Be Used As A Co-culture in Food Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 235-240.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : BİGEÇ, Leyla
 Uyruğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri : 14.08.1988, Ankara
 Medeni Hali : Bekâr
 Telefon : 0(312)436 19 72
 e-mail : leylabigec@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Ankara Kurtuluş Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013 - Devam	Başkent Karizma Dersanesi	Biyoloji öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayın

Bigeç, L., Gündoğan, N. (2014,Haziran). *Balıklardan İzole Edilen Enterococcus Türlerinin Bazı Virulans Özelliklerinin Araştırılması*. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde poster olarak sunuldu, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

Hobiler

Kitap okumak, sinemaya gitmek, keman çalmak, yürüyüş yapmak, müzik dinlemek.



GAZİ GELECEKTİR