

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice ULUDAĞ

**KLİNİK VE GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN
ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN BAZI PATOJEN BAKTERİLER
ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2015

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK VE GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN
ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNLERİN BAZI PATOJEN BAKTERİLER
ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Hatice ULUDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez .../.../... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Mehmet GÜVEN
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2010YL83**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilerin, çizelge şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki
hükümlere tabidir

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK VE GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN BAKTERİYOSİNİN BAZI PATOJEN BAKTERİLER ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hatice ULUDAĞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Yıl: 2015, Sayfa: 99

Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

: Prof. Dr. Mehmet GÜVEN

: Yrd. Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada, hem gıda kökenli hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarından (*E. faecium* ve *E. faecalis*) kısmi saflaştırma ile bakteriyosinler elde edilmiş ve bu bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Salmonella* Enteritidis) karşı antimikrobiyel aktiviteleri karşılaştırılmıştır. 20 adet enterokok suşundan elde edilen bakteriyosinlerin, 13'ü *S. Enteritidis*'e karşı (L13, P18, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V105, V188, V150, V198) ; 8'i *B. cereus*'a karşı (L13, JS1, A1, E5, LS1, 226, 227, V198); 4'ü *E. coli*'ye karşı (L13, P18, 227, V98), ve 1'i de *S. aureus*'a karşı (L13) antimikrobiyel etki göstermiştir. Gıda kaynaklı enterokok suşu olan L13 (*E. faecium*) çalışmamızda kullanılan tüm patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyel etki göstermiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda daha çok gıda kaynaklı enterokok suşlarının doğal koruyucu olarak kullanım potansiyelleri üzerinde durulmuştur. Diğer yandan, klinik kaynaklı enterokokların da yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteriyosin üretmeleri, bunların da doğal koruyucu olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Enterokok, bakteriyosin, antibakteriyel

ABSTRACT

MSc THESIS

COMPARISON OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST SOME PATHOGENIC BACTERIA OF BACTERIOCINS PRODUCED BY CLINICAL AND FOOD BORNE ENTEROCOCCI

Hatice ULUDAĞ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Year: 2015, Pages: 99

Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

: Prof. Dr. Mehmet GÜVEN

: Asst. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

In this study, bacteriocins were obtained from Enterococci strains isolated from both foods and clinical sources by partial purification and antimicrobial activity of these bacteriocins against some pathogenic microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella Enteritidis*) were compared. The 13 of 20 bacteriocins obtained by Enterococcus strain showed antimicrobial effect against *S. Enteritidis* (L13, P18, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V105, V188, V150, V198), 8 of 20 have an antimicrobial effect against *B. cereus* (L13, JS1, A1, E5, LS1, 226, 227, V198), 4 of 20 have an antimicrobial effect against *E. coli* (L13, P18, 227, V98) and 1 of 20 have an antimicrobial effect against *S. aureus* (L13). Food origin enterococcus strain L13 (*E. faecium*) shows the antimicrobial effect on all of the pathogen microorganisms which used in our study. In studies so far, food-borne strains of enterococci mostly have focused on the potential use as a natural preservative. On the other hand, enterococci of clinical origin also produce bacteriocins with high antimicrobial activity and this situation also emphasizes the need to investigate their potential use as a natural preservative.

Keywords: Enterococci, bacteriocin, antibacterial

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince çalışmalarımın her aşamasında değerli görüşlerini aldığım, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yüksek lisans öğrenimime tereddütle başladığım ilk gün güleryüzlülüğü ile düşüncelerimi değiştiren ve bana anlayış gösteren, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin geliştirilmesinde, değerli bilgi ve görüşlerini paylaşan, jüri üyelerimden sayın Prof. Dr. Mehmet GÜVEN'e ve yine şuan jüri üyelerimden olması benim yüksek lisans öğrenimimin en unutulmaz anı olarak yer edinecek olan, tezimin her aşamasında emeği olan, paylaşımıyla bir aile ortamındaymışım hissini bana her daim yaşatan sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, en bunaldığım anlarda bile gülerek keyifli zamanlar yaşadığım, sıkıntılı anlarımda beni sabırla dinleyen, ne zaman arasam bıkmadan usanmadan bana yardımcı olan yüksek lisansımın bana kazandırdığı en güzel değerlerinden olan sevgili arkadaşım Ganim Alin TÜREMİŞ'e, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, ilk tanıştığımızda yanında ağlayarak gönlümü açabilecek kadar bana güven veren, manevi desteğini hep hissettiren değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Selin KALKAN'a,

Maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, sevgiyle büyümemi sağlayan, ne yaşarsan yaşa biz hep varız güvenini her zaman hissedebildiğim, varlıklarıyla şükretme nedenim olan sevgili annem Zekiye ULUDAĞ'a ve sevgili babam Ertuğrul Nedim ULUDAĞ'a,

Birlikte büyüdüğüm, hayatımın en güzel dönüm noktalarını birlikte yaşadığım ve yaşamaya da devam edeceğim, hayata dair beni her zaman güçlü kılan, en umutsuz olduğum zamanlarda bile bana sahip olduklarımı hatırlatan, varlığıyla huzur bulduğum hayat arkadaşım Yaşar LOĞOĞLU'na, 19 yılımın en büyük yol göstericisi olan bana hayatı öğreten sevgili annem Hayrunnisa LOĞOĞLU'na ve sevgili babam Osman LOĞOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda bana maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: ZF2010YL83) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Enterokoklar	7
2.1.1. Enterokokların Genel Özellikleri ve Patojenitesi	7
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Genel Özellikleri ve Patojenitesi.....	10
2.3. <i>Bacillus cereus</i> 'un Genel Özellikleri ve Patojenitesi.....	12
2.4. <i>Escherichia coli</i> 'nin Genel Özellikleri ve Patojenitesi	14
2.5. <i>Salmonella Enteritidis</i> 'in Genel Özellikleri ve Patojenitesi.....	15
2.6. Bakteriyosinler	16
2.6.1. Bakteriyosinlerin Tanımı ve Genel Özellikleri	16
2.6.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	18
2.6.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezi	21
2.6.4. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları	23
2.6.5. Bakteriyosinlerin Üretimi, Antimikrobiyel Aktiviteleri ve Stabilitelerini Etkileyen Faktörler	26
2.6.6. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları.....	29
2.6.6.1. Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı	29
2.6.6.2. Bakteriyosinlerin Klinik Kullanım Alanları	33
2.7. Bakteriyosinlere Direnç	34
2.8. Enterosinler	35
2.9. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Enterosinlerin Önemi.....	36

2.10. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	38
2.11. Gıdalarda Enterosin Kullanımıyla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	43
3. MATERYAL VE METOD	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Bakteri Kültürleri	45
3.1.2. Besiyerleri ve Çözeltiler	46
3.2. Metod	47
3.2.1. Enterokok Stok Kültürlerinin Saklanması	47
3.2.2. Enterokok Ön Kültürlerinin Hazırlanması	47
3.2.3. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması	47
3.2.4. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	51
4.1. Kısmi Olarak Saflaştırılmış Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi.....	51
4.1.1. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin <i>S. Enteritidis</i> 'e Karşı Antimikrobiyel Etkileri.....	51
4.1.2. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin <i>B. cereus</i> 'a Karşı Antimikrobiyel Etkileri	55
4.1.3. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin <i>E. Coli</i> 'ye Karşı Antimikrobiyel Etkileri.....	58
4.1.4. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin <i>S. aureus</i> 'a Karşı Antimikrobiyel Etkileri	61
4.2. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Bakteriyosinlerin Bazı Patojen Mikroorganizmalara Karşı Gösterdikleri Antimikrobiyel Etkilerinin Karşılaştırılması	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar	32
Çizelge 3.1. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok izolatları.....	45
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, inkübasyon koşulları ve kullanım amaçları	46
Çizelge 4.1. Gıda Kaynaklı Enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları.....	63
Çizelge 4.2. Klinik Kaynaklı Enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Bakteriyosinlerin Sınıflandırması	20
Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezleri	22
Şekil 2.3. Barrel-stave mekanizması ile por oluşumu	24
Şekil 2.4. Wedge-Model ile por oluşumu	25
Şekil 2.5. Lipit II model mekanizması ile por oluşumu	25
Şekil 2.6. Bakteriyosinlerin kullanım alanları.....	29
Şekil 3.1. Enterokok izolatlarından bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	48
Şekil 3.2. Disk difüzyon metodu ile antimikrobiyel etkinin belirlenmesi.....	50
Şekil 4.1. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>S. Enteritidis</i> ' e karşı inhibisyon etkileri	52
Şekil 4.2. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>S. Enteritidis</i> ' e karşı inhibisyon etkileri	53
Şekil 4.3. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>B. cereus</i> ' a karşı inhibisyon etkileri	55
Şekil 4.4. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>B. cereus</i> ' a karşı inhibisyon etkileri	56
Şekil 4.5. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>E. coli</i> 'ye karşı inhibisyon etkileri	58
Şekil 4.6. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>E. coli</i> 'ye karşı inhibisyon etkileri	59
Şekil 4.7. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin <i>S. aureus</i> 'a karşı inhibisyon etkileri	61

1. GİRİŞ

Günümüzde kullanılan modern teknolojiye ve çeşitli güvenlik sistemlerine rağmen gıda kaynaklı hastalıkların ve intoksikasyonların sayısı artmaktadır. Başta et, süt, deniz ve yumurta ürünleri olmak üzere, tüm temel gıdalar aracılığı ile (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Clostridium perfringens* gibi) patojen mikroorganizmaların neden olduğu çok sayıda hastalık vakası meydana gelmekte ve ölümlere yol açmaktadır. Ayrıca, giderek artan nüfus yoğunluğu ile ihtiyaç duyulmuş olan büyük marketlerde gıdaların raf ömrünün dolması ya da bu gıdaların bakterilerin faaliyetleri sonucunda bozulmaları nedeni ile dünyada yüksek miktarda gıda kayıpları meydana gelmektedir. Bu durum, gıdaların mikrobiyal patojenlerden ve bozulma etmenlerinden korunmasına önem kazandırmıştır (Demir, 2014).

Her geçen gün gelişen modern teknoloji gıda endüstrisinde kullanılıyor olmasına rağmen, gıdaların korunması sadece gelişmekte olan ülkeler için değil; gelişmiş ülkeler için de hala önemli bir sorun oluşturmaktadır. Gerek gıda zincirinde ve gerekse tüketici beklentilerinde; gıda güvenliğinin sağlanması, gıda bozulmalarından kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılması, gıda işleme maliyetinin düşürülmesi, tüketici beklentilerini karşılayabilecek, tüketime hazır, taze, besin değeri yüksek, vitamince zengin, az işlem görmüş ve yasal sınırlar içerisinde kimyasal koruyucu içeren gıdaların üretilmesi gıda endüstrisinin ana hedefleri arasındadır (Koral, 2011).

Mikrobiyel bozulmalarla ortaya çıkan ekonomik kayıpları önlemede, gıda kaynaklı hastalıkları azaltmada ve hızla artan dünya nüfusunun gıda gereksinimlerini karşılamada, daha uygulanabilir ve güvenli muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesini hedefleyen çalışmalar önemini giderek artırmaktadır. Buna göre, gıda endüstrisinde mümkün olduğunca ürünün orjinal değerini koruyacak çalışmalarla gıda kaynaklı sorunların çözümünde tatmin edici sonuçlara varılacağı düşünülmektedir (Galvez ve ark, 2008).

Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında mümkün olduğunca, özellikle risk grubu tüketiciler için doğal katkı maddelerinin kullanımı önerilmekte ve bu amaçla biyokontrol yöntemi ile ilgili araştırmalara ağırlık verilmektedir. Diğer yandan, gıda güvenliği açısından kimyasal formülasyona sahip gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular ya da antimikrobiyel koruyucuların kullanımı tavsiye edilmektedir (De Martinis ve ark, 2002).

Biyokoruma yöntemi, çoğunlukla, gıdaların raf ömrünü uzatmak veya gıda güvenliğini artırmak amacıyla, ya gıdaların doğal mikroflorasından yararlanılarak, ya da antimikrobiyel özelliğe sahip starter kültür veya bu kültürlerin ürettikleri metabolitlerin ürüne ilavesi ile gerçekleşmektedir. Üründe, gıda güvenliği ve kalitesini sağlamak için patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolü önemlidir (Schnurer ve Magnusson, 2005). Biyokoruma amacıyla ilave edilen kültürler, üründe olası patojenlerin inhibisyonunu sağlamak ve ürünün raf ömrünü uzatmak için kullanılan, gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan kültürlerdir (Devlieghere ve ark, 2004; Seçkin ve Baladura, 2010; Türemiş, 2012).

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmeleri için, tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Tüketici talebine bağlı olarak, birçok gıdanın fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin (raf ömrü) uzatılması için çeşitli katkı maddeleri (antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler vs.) kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalarda gıda katkı maddelerinin bazılarının sağlıksız oldukları ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yaptıkları ortaya çıkmıştır. Bu da, doğal, güvenilir katkı maddelerinin elde edilmesini ve kullanımını gündeme getirmiştir (Doğan, 2009).

Bazı mikroorganizmaların antagonistik özelliklerinden yararlanılarak, patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların, inhibisyonu sağlanmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin önemli bir kısmı, antimikrobiyel bileşenler üretmelerine rağmen, gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterileri (LAB) ayrı bir öneme sahiptir (De Martinis ve ark, 2002). LAB “food-grade” organizmalar olarak kabul edilirler ve “koruyucu kültür” özelliklerini taşırlar. LAB, organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyel enzimler ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyel

olarak aktif metabolitlerin biri veya birkaçının üretimi ile diğer mikroorganizmaları inhibe ederek, antagonistik etki gösterirler (Työppönen ve ark, 2003; Devlieghere ve ark, 2004).

Laktik asit bakterileri, Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, basil ve kok şeklinde, katalaz negatif, aside dayanıklı nitrata indirgemeyen, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten doğal bir gruptur. LAB grubu içinde yer alan cinsler; *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Vagococcus* ve *Aerococcus*'lardır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Bilgin, 2008).

Laktik asit bakterileri içinde yer alan ve önemli bir cins olan enterokoklar, gram pozitif, katalaz negatif, 10-45°C'de üreyebilen, %6,5 NaCl bulunan ortamda ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan fakültatif anaerob koklardır (Giraffa, 2003; Türemiş, 2012). Bunlar kemoorganotrofikler ve homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar. *Enterococcus* cinsi içinde şu ana kadar tanımlanmış 32 tür bulunmaktadır. Bunlardan *E. faecalis* ve *E. faecium* en önemli iki tür olup, insanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadır (Karakaş, 2005).

Her yerde bulunabilen *Enterococcus* cinsi bakteriler, lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikler sentezleme gibi özellikleri nedeniyle, gıdalarda starter kültür olarak kullanılma potansiyelleri de söz konusudur (Giraffa, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008; Türemiş, 2012).

Yüksek sıcaklığa toleransları ve kötü çevresel koşullarda üreyebilmeleri nedeniyle çeşitli ortamlarda kolonize olabilirler. Bu mikroorganizmalara dışkı, toprak, yüzey suları ve bitki materyallerinin yanı sıra et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalarda oldukça rastlanır (Domig ve ark, 2003; Klein, 2003).

Diğer yandan, enterokokların bazı türleri, klinik açıdan da çok önem taşımaktadır. Özellikle, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis*, genellikle gıda mikrobiyolojisi açısından zararsız mikroorganizmalar olarak bilinmesine karşın, hastane enfeksiyonlarında etkin rol almaktadırlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde

sağlıklı bireylerin ortalama %5-20'sinde, *Enterococcus* kolonizasyonu ya da enfeksiyonu rapor edilmiştir (Namdari, 1998).

Tüketicilerin doğal ve katkısız gıda ürünlerine yönelik tercihlerinin artmasından dolayı biyokoruyucu olarak LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler önem kazanmıştır (Rossland ve ark, 2005; Steffen, 2005; Gwen, 2006). Biyolojik koruyucu (biyopreservatif) uygulamalarında, özellikle bakteriyosin ve/veya diğer inhibitör madde üreten laktik asit bakterilerinin kullanımına olan ilgi artmıştır. Uzun yıllardan beri güvenle kullanılmaları, GRAS olarak belirlenmeleri ve ilginç metabolik karakteristikleri, geniş alanda endüstriyel uygulamalara olanak tanımaktadır (Biler, 2009). Bakteriyosin üretebilen laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı çeşitli bakterilere özellikle de Gram pozitif olanlara “sidal” ya da “statik” etkili olmaları, onların gıda koruma amaçlı olarak kullanım potansiyelleri bulunduğunu göstermektedir (Karagül, 2010). Ayrıca, laktik asit bakterileri, patojen olan *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *Salmonella* gibi bakteriler üzerine inhibisyon etkileri birçok araştırma ile belirlenmiştir. Bu nedenle, bakteriyosinlerin gıdalarda biyolojik bir koruyucu olarak kullanımı büyük ilgi çekmektedir (Ananou ve ark, 2007).

Doğal kaynaklı ve güvenli olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın gıda kaynaklı bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler önemli biyokoruyucular arasında yer almaktadırlar (Cutter ve Siragusa, 1995; Papagianni, 2003).

Bakteriyosinler, klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve ince bağırsaklardan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadırlar. Bu nedenle vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşamazlar.

Gıdalara koruyucu olarak bakteriyosin ilavesi ile;

- Gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte,
- Saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda ekstra koruma sağlanmakta,
- Gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılım riski azaltılabilmekte,

- Gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte,
- Kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte,
- Koruma için daha az prosesin uygulanması sebebi ile ürünün organoleptik özellikleri ve besinsel değeri de daha iyi korunabilmektedir (Thomas ve Wimpenny, 1996).

*Enterococcus*lar'ın ürettiği bakteriyosinler, “enterosin” olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosin üreten *Enterococcus*'lar doğaya yaygın olarak bulunmakta olup, süt ürünleri, fermente sucuklar, balık, sebze ve ürünlerinin yanı sıra, gastrointestinal yoldan izole edilmişlerdir (Sarantinopoulos ve ark, 2001).

E. faecium ve *E. faecalis* suşlarının ürettikleri enterosinler, diğer bakteriyosinlere göre daha iyi fizikokimyasal özellik ve biyolojik aktivite gösterdikleri için, teknolojik potansiyel taşıyan bakteriyosinlerdir (Park ve ark, 2003; Moreno ve ark, 2003). Enterosinler, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. ve diğer gram pozitif patojenik bakteriler ile gıda bozulmasına neden olan bakterilere karşı inhibitör etki gösteren antimikrobiyel peptid ve proteinlerdir (Hugas ve ark, 2003; Leroy ve ark, 2003; Saavedra ve ark, 2003). Bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium*'un aynı zamanda iyi bir rekabetçi olması bu organizmanın teknolojik açıdan önemini arttırmaktadır.

Gıdalarda bakteriyosin kullanımı iki şekilde olmaktadır. Ya bakteriyosin üreten suş starter kültür olarak ya da üretici kültürden saflaştırılan bakteriyosinin gıda ürününe eklenmesiyle kullanılmaktadır (Hugas ve ark, 2003). Pek çok gıdada *E. faecalis*'in yaygın bulunuşu her zaman için doğrudan fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemelidir. Enterokokların gıdalarda sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değil ayrıca gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerektiği belirtilmektedir (Klein, 2003; Foulquie ve ark, 2006). Gıda mikrobiyolojisi açısından yukarıda da sözü edilen birçok özellikleri nedeniyle, enterokoklar oldukça önemlidir.

Diğer yandan klinik mikrobiyolojide enterokokların nozokomiyal (hastane) enfeksiyonlarına neden olmaları, yüksek antibiyotik dirençlerinin (doğal veya

kazanılmış) olması ve direnç genlerini diğer patojenlerine aktarabilmeleri, bu konuyu daha da önemli hale getirmiş ve gıda zincirinde yer alan enterokoklar ile klinik kökenli enterokokların özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Diğer yandan; probiyotik etkiye sahip olan enterokoklar kolonize oldukları mikro çevrede diğer laktik asit bakterileri ile birlikte ortam pH'sını 4,5'in altına düşürerek diğer istenmeyen bakterilerin kolonizasyonunu engellerler. *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının ürettikleri enterosinlerin, diğer bakteriyosinlere göre daha iyi fizikokimyasal özellik ve biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı, teknolojik potansiyel taşıyan bakteriyosinler olabilecekleri ileri sürülmüştür (Ennahar ve ark, 2001; Park ve ark, 2003; Leroy ve ark, 2003; Moreno ve ark, 2003; Linaje ve ark, 2004; Franz ve ark, 2011). Gıda kaynaklı enterokokların klinik enfeksiyonlar ile ilişkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak gıda kaynaklı izolatların horizontal gen aktarımı ile virülans genlerinin yayılmasında rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür. Moleküler bazlı çalışmalarda, klinik kaynaklı *E. faecalis* suşlarının gıda kaynaklı olan suşlara göre daha fazla virülans faktörüne sahip oldukları gösterilmiştir. (Adams, 1999; Franz ve ark, 2001; Giraffa, 2002; Valenzuela ve ark, 2009). Virulans özellikleri ve antibiyotik dirençliliklerine yönelik çalışmalarda, gıdalarda kullanılan enterokoklarda, agregasyon faktörünün olması, bakterinin dokuya yapışmasını sağladığından (özellikle probiyotik olarak kullanılan suşlarda) istenen bir özellik olmasına karşın, ortamda bulunabilecek diğer patojen mikroorganizmalara, bu genlerin aktarılabilmesi önemli bir risk olduğu belirtilmiştir (Terkuran, 2013). Yine, her iki kaynaktan izole edilen enterokokların bakteriyosinlerinin, farklı ortam koşullarında anti-listerial özellikleri karşılaştırılmıştır (Türemiş, 2012). Yukarıda belirtilen çalışmalara ilaveten, klinik kökenli enterokoklarla, gıda kaynaklı enterokokların ürettikleri bakteriyosinlerin diğer bazı gıda patojenlerine karşı antibakteriyel etkilerinin farklı olup olmadığı konusunda temel bilgilerle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, 2009 ve 2011 döneminde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde takip edilen hastalara ait klinik örneklerden ve değişik gıdalardan izole edilen enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojenler üzerine antibakteriyel özellikleri araştırılarak, karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enterokokların Genel Özellikleri ve Patojenitesi

Enterococcus spp., laktik asit bakterileri arasında yer alan hem gıda mikrobiyolojisi hem de klinik mikrobiyoloji açısından önem taşıyan bakterilerdir (Vuyst ve ark, 2003; Klein, 2003; Erginkaya ve ark, 2007). *Enterococcus* cinsi bakteriler taksonomide 1984 yılından önce *Streptococcus* cinsi altında yer almaktaydı. *Enterococcus*'ların ilk tanımlanması Thiercelin tarafından 1989 yılında yapılmış ve 1903 yılında Thiercelin ve Jouhaud tarafından *Enterococcus* olarak tanımlanmıştır. 1906 yılında Andrews ve Harder eski sınıflandırmada *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* olarak adlandırılan bakterileri, yeni sınıflandırmada, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olarak adlandırmışlardır (Franz ve ark, 2003; Doming ve ark, 2003).

Lancefield D grubu içinde yer alan bu bakteriler, karbonhidratları fermente ederek, L (+) laktik asit oluştururlar ve bu özelliklerinden dolayı tipik homofermentatif laktik asit bakterileri olarak bilinirler. Laktik asit fermentasyonu sırasında gaz oluşturmazlar ve son pH 4.2-4.6'dır (Doming ve ark, 2003; Linaje ve ark, 2004).

Enterococcus'lar, tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. Optimum gelişme sıcaklıkları, 30-35°C olup, birçoğu, 10 ile 45°C arasında değişen sıcaklıklarda gelişebilirler. Enterokoklar, aerobik ya da fakültatif anaerobiktirler, %6,5 NaCl'lü ortamlarda gelişebilen ve 60°C'de 30 dakika canlı kalabilmektedirler. Ayrıca, pH 9,6'da, %40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilme özelliğine sahiptirler. Sitokrom enzimleri olmadığından, katalaz negatiftirler ve glikozdan gaz oluşturmazlar. Kanlı agarda, enterokok kolonileri belirgin, gri, parlak görünümde olup, alfa, beta hemolitik ya da non-hemolitiklerdir. *E. flavescens*, *E. casseliflavus*, ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidirler (Teixeira ve Facklam, 2003; Yıldırım, 2007; Vilas, 2011; Türemiş, 2012).

Enterococcus cinsi bakteriler, her yerde bulunabilme özelliğine sahiptirler. Bu bakteriler, insan ve hayvan bağırsaklarında normal floranın bir parçasıdır ve

memelilerin gastrointestinal yolundaki bakterilerin büyük bir kısmını oluştururlar (Semedo ve ark, 2003; Kühn ve ark, 2003). Yüksek sıcaklığa toleransları ve kötü çevresel koşullarda üreyebilmeleri nedeniyle çeşitli ortamlarda kolonize olabilirler. Bu mikroorganizmalara dışkı, toprak, yüzey suları ve bitki materyallerinin yanı sıra et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalarda oldukça rastlanır (Birollo ve ark, 2001; Giraffa, 2002; Marekova ve ark, 2003). Ayrıca gıdaların mikroflorasının önemli bir kısmını oluştururlar (Franz ve ark, 1999; Vuyst ve ark, 2003).

Enterococcus cinsi bakteriler endüstriyel potansiyeli açısından önemli olup, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* gıda endüstrisi açısından en önemli olan türlerdir. Bu türler, özellikle süt endüstrisi açısından büyük öneme sahiptirler (Axelsson, 1993; Giraffa, 2003; Leroy ve ark, 2003). Bu bakteriler, çeşitli geleneksel fermente ürünlerin üretiminde önemli rol oynamaktadırlar (Giraffa, 2003; Erginkaya ve ark, 2007). *Enterococcus*'lar, lipolitik ve esterolitik aktivite, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikler sentezleme gibi özellikleri sayesinde, gıdalarda bazı laktik asit bakterileri ile birlikte, en yaygın starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, özellikle süt ve et ürünlerinin doğal floralarının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermentasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Ross ve ark, 2002; Hugas ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, genellikle kümes hayvanları ve çiftlik hayvanlarının beslenmesinde kullanılmaktadır ve ayrıca probiyotik olarak gıda ürünlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Vuyst ve ark, 2003; Giraffa, 2003; Klein, 2003; Kühn ve ark, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterococcus'lar, probiyotik olarak insanlarda ve hayvanlarda bağırsak florasında mikrobiyel dengeyi sağlamak için kullanılmaktadırlar (Franz ve ark , 1999). *Enterococcus* cinsi içinde probiyotik özellik gösteren iki tür *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* olarak bilinmektedir (Birollo ve ark, 2001; Erginkaya ve ark, 2007).

Probiyotik kültür olarak, *Enterococcus* içeren bazı eczacılık ürünleri, insanların klinik tedavisinde kullanılmaktadırlar. *Enterococcus faecium*'un, insanlarda diyarenin tedavisinde probiyotik olarak kullanımının, antibiyotik uygulamalarına bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. *Enterococcus faecium*'un,

insanlarda probiyotik etkisi ise, kolesterolün sindirim sisteminden kana absorpsiyonunun azaltılması şeklindedir (Saavedra ve ark, 2003; Hugas ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007). Ancak bu yararlı etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bazı LAB gıdalarda bozulma etmeni oldukları gibi, bazı enterokok suşları özellikle antibiyotiğe (metisilin, vankomisin) dayanıklı olan suşlar, insan ve hayvanlar için patojendirler (Franz ve ark, 2003; Kayser, 2003; Ogier and Serror, 2008).

Bazı enterokok suşları fırsatçı insan patojenidir. Bu bakteriler bakteriyemi, endokarditis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlarda yaygın görülen bakteriler arasında yer alır (Özden ve ark, 2013). Enterokokların antibiyotik direnci bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan faktörlerden biridir. Özellikle vankomisin dirençli enterokok suşları insan enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problemlerden biridir. Vankomisin, çoklu antibiyotik direnç özelliği olan enterokokların tedavisinde başvuru son çare olarak nitelendirilir (Ogier ve Serror, 2008).

Antibiyotik direnç özelliğinin dışında hemolizin/sitolizin (*cylM*, *cylB* ve *cylA*), agregasyon maddesi (*agg*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), jelatinaz (*gelE*), seks feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf* ve *cad*) ve hücre duvarı adhezi (*efaA*) gibi çeşitli virülans faktör genleri enterokoklarda tanımlanmıştır. (Cariolato ve ark, 2008; Inoğlu ve Tuncer, 2013).

Bazı suşlarının iyi bilinen yararlı etkilerinin yanında enterokoklar bakteriyemi, endokarditis, üriner sistemde ve diğer dokularda enfeksiyonlara neden olan hastane kaynaklı patojen olarak da dikkat çekmektedir. Enterokokların hastanelerde önem kazanmasının bir diğer nedeni de antibiyotiklere artan oranda direnç göstermeleridir. Antibiyotik dirençliliği, enterokokların hastane ortamında canlılığını sürdürmesine ve dirençli suşların yayılmasına neden olmaktadır.

Antibiyotiğe dirençli enterokok (ARE) suşlarına gıdalarda yaygın olarak rastlanılmaktadır. Bu suşlar et ürünlerinde, süt ürünlerinde, hazır gıdalarda bulunabilmekte ve hatta probiyotik olarak kullanılan suşlar dahi antibiyotiklere dirençli olabilmektedir. Bu nedenle gıdalarda kullanılan yardımcı ya da starter enterokok kültürlerinin, suş spesifikliği göz önüne alınarak kazanılmış (transferable)

antibiyotik dirençliliği yönünden güvenli olup olmadığının kontrol edilmesinin gereği üzerinde durulmaktadır (Peters ve ark, 2003; Foulquie ve ark, 2006).

Enterokokal enfeksiyonların %60 kadarının özellikle, anti-enterokokal etkisi olmayan metronidazol, klindamisin gibi antianaerobik etkili ve sefalosporinler gibi geniş-spektrumlu antibiyotiklerin, sıklıkla kullanıldığı yoğun bakım ünitelerinde meydana geldiği ifade edilmektedir (Yalçın, 2009).

Probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan veya kullanılması düşünülen *Enterococcus* cinsine ait suşların, antibiyotik dirençliliği, direnç transfer özellikleri ve virulans faktörleri gıda güvenliği açısından araştırılarak tartışılmalıdır (Vuyst ve ark, 2003; Erginkaya ve ark, 2007; Valenzuela ve ark, 2009). Günümüzde, modern analiz tekniklerinin gelişmiş olması, *Enterococcus*'ların özelliklerinin bilinmesinde ve bazı gıdalarda kullanımının kabulünde, yardımcı olacaktır (Foulquie ve ark, 2006; Erginkaya ve ark, 2007; Türemiş, 2012).

2.2. *Staphylococcus aureus*'un Genel Özellikleri ve Patojenitesi

Staphylococcus aureus, başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların inhibisyonuna yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek hassasiyet gösteren bir bakteri türüdür (Charlier ve ark, 2008). *Staphylococcus aureus*'un kontaminasyon kaynakları; mastitisli süt, kirli eller ve yetersiz sanitasyon uygulanmış alet ve ekipmandır (Çakır, 2011).

Staphylococcaceae familyasına ait olan *Staphylococcus*' lar, Gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapında, kok şeklinde, spor oluşturmayan, hareketsiz, katalaz pozitif ve fakültatif anaerob bakterilerdir. Familyanın en önemli türü, koagulaz pozitif ve termonükleaz pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'dur. *S. aureus*, başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermesine rağmen insanlarda hastalığa neden olan ve yüksek derecede ısı stabilitesi gösteren protein yapısında toksinler üretmektedir (Akçelik ve ark, 2000; Anonymous, 2005a). Gelişme sınırları 10-45°C arasında olup, optimum 30-37 °C'dir. %10 NaCl içeren ortamlarda iyi gelişebilirken, %15'lik tuz ortamında daha zayıf gelişim gösterirler. Anaerobik koşullarda glikozdan D ve L- laktat

üretirler. Ortamına glikoz eklenmesi trikarboksilik asit döngüsünü baskılayarak asetat ve karbondioksit birikimine neden olur. Protein A üretirler, nitratları indirgerler, alkalın fosfotaz, kazeinaz, katalaz, koagülaz, jelatinaz, fibrinolizin, lipaz, esteraz, sıcaklığa dayanıklı nükleaz, hemolizin, clumping faktör, üreaz ile pozitif reaksiyon verirler, amilaz, ornitin dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz ve oksidaz ile negatif reaksiyon verirler. Eskülin ve nişastayı hidrolize edemezler. Aerobik koşullar altında, fruktoz, galaktoz, glikoz, gliserol, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, riboz, sükroz, turanoz ve trihaloz ile asit üretirler. Bir kaç suşu laktoz, galaktoz, turanoz veya mannitolden saptanabilir düzeyde asit üretemez. Adonitol, arabitol, arabinoz, sellobiyoz, dekstrin, dulsitol, erithritol, eritroz, fruktoz, gentiyobiyoz, inositol, liksoz, melesitoz, melibiyoz, rafinoz, ramnoz, salisin, sorbitol, sorboz, ksilitol ve ksiloz'dan asit üretemezler. Novobiosine duyarlıdır, penisilin G ve metisiline ise direçlilik oldukça yaygındır (Schleifer ve Bell, 2009; Korkmaz, 2012).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerine en çok protein ve karbonhidrat yönünden zengin ve işlem görmüş gıdalar sebep olmaktadır. Bunlar et (sığır, kanatlı, domuz) ve et ürünleri (pastırma, sucuk vb.), süt ve süt ürünleri, yumurta, balık, kabuklu deniz ürünleri, et suyu ile yapılmış çorba ve soslar, salatalar (özellikle tavuklu, salamlı, patatesli yapılanlar), kremalı pastacılık ürünleri, dondurma gibi gıdalardır (Atanassova ve ark, 2001; Erol, 2007).

S. aureus, dünyadaki gıda kaynaklı hastalık etmenleri arasında her zaman ilk sıralarda yer almaktadır (Normanno ve ark, 2007). A.B.D.'de her yıl yaklaşık 185,000 *Staphylococcal* gıda zehirlenmesi vakası bildirilmektedir. Gıda zehirlenmesine neden olan bakterinin kendisi değil, salgıladığı enterotoksindir. Zehirlenmelerde en çok rol oynayan etkenler kremalı tatlılar, et ve et ürünleri, tavuk etleri, et suları ve soslar, yumurtalı ve etli salatalar ve kremalı salata sosları olmaktadır. Bu tür gıdaların saklanması soğuk zincir kurallarına uyulmazsa hızlı bakteriyel üreme ve enterotoksin üretimi ortaya çıkabilir. Bu durumda ürünün yeniden ısıtılması yetersiz kalabilmektedir; çünkü toksin ısıya oldukça dayanıklıdır ve aktivitesini koruyabilir (Madigan ve Martinko, 2006).

Ozmotolerant özellikte olan *S. aureus*, düşük aw değerlerinde üreyebilen en önemli patojen bakterilerden biridir. Ayrıca sporsuz patojen bakteriler içinde özellikle kuru çevresel koşullarda uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptir. Üremesi ve toksin oluşturabilmesi için ihtiyaç duyduğu en düşük aw değeri 0,83–0,86'dır. *S. aureus* %20 tuz konsantrasyonlarına kadar üreyebilmekte ve %10'a kadar olan tuz konsantrasyonlarında da toksin oluşturabilmektedir. Toksin oluşumu 10–47,8°C arasında gerçekleşebilmektedir (Uğur ve ark. 2003; Koneman ve ark, 2006; Erol, 2007).

Enterotoksijenik *S. aureus* taşıyıcısı olan ve özellikle gıda üretim, muhafaza, taşıma, hazırlama ve servis işlemlerinin herhangi bir aşamasında gıdaya direkt temas eden personelin stafilocok gıda zehirlenmelerinin önemli kaynağı olduğu bildirilmiştir (Gülbandılar, 2006). Dolayısıyla gıdalarda, personel ve ekipmanlarda bu bakteriye veya enterotoksinlerine rastlanması hijyen kurallarına yeterince uyulmadığını göstermektedir. Bu nedenle gıdalarda ve gıda işletmelerinde, bu bakteriye rastlanması hijyen kriteri olarak kabul edilmektedir (Ayçiçek ve ark, 2004; Korkmaz, 2012).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinin başlangıcı hızlı ve şiddetli olabilmektedir. Bu da kişinin toksine karşı dayanıklılığına ve hassasiyetine, yenilen gıda miktarına ve kişinin genel sağlığına bağlı olabilmektedir. *S. aureus*'un neden olduğu hastalıkların oluşma süresi ortalama 1-6 saattir. Belirtileri; çok sayıda kusma, ishal, karın bölgesi kramplarıdır (Anonymous, 2004b). Bu tür gıda zehirlenmelerinde çok nadir olarak ölümle karşılaşmaktadır. Ancak oldukça yaşlı kişilerde, küçük çocuklarda, bebeklerde ve aşırı derecede güçsüz insanlarda ölümle sonuçlanabilmektedir (Anonymous, 2005a).

2.3. *Bacillus cereus*'un Genel Özellikleri ve Patojenitesi

Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *B.cereus*, toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Kalkan ve Halkman, 2006). *Bacillus cereus* sporları, olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır. Kurutma, dondurma, vakumlama, ısıtma işlemlerine dirençlidirler. Ayrıca çeşitli kimyasal

maddeler ve dezenfeksiyon işlemlerine de dayanıklı oldukları tespit edilmiştir (Güler, 2006). Optimum üreme sıcaklığı, suşlara göre 28–35°C arasında değişmekle birlikte genellikle 30°C’ dir. Gelişebildiği pH aralığı 4.9-9.3 olup optimum 7.0’ dır. Lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olan *B.cereus* nitratı indirger ve polimiksine dirençlidir. Birçok suşu da %7.5 tuzda üreyebilir. *Cereus* adını tahıl anlamındaki cereal’ dan alır. Özellikle *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı soğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında, canlı ve ısıya dirençli olan sporların çimlenmesi sonucu mikroorganizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir. Gıda zehirlenmeleri, gıdadaki bakteri sayısı 10^6 /g olduğunda ortaya çıkmaktadır (Kalkan ve Halkman, 2006; Ahmetoğlu, 2011). *B. cereus* zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak, pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir. Ayrıca, toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilen *B. cereus*, sporlu bir bakteri olduğu için et ve süt ürünlerinde de bulunabilir. *B.cereus*, insan patojeni olmak yanında salgıladığı proteaz enzimi ile özellikle UHT sütlerde sorun çıkaran bir bakteridir (Kalkan ve Halkman, 2006).

Bacillus cereus, emetik ve diyarejenik enterotoksin olmak üzere iki farklı tip enterotoksin sentezler ve dolayısıyla iki farklı tip zehirlenmeye neden olur. Bunlardan biri “Akut başlayan Kusma tipi Sendromu” olup daha çok pişmiş pirinç ve pirinçli gıdalarda oluşan zehirle ilişkilidir. Kusturucu zehir olarak isimlendirilen bu zehir ısı ile, pH’nın yanı sıra tripsin ve pepsin enzimlerine de dirençlidir. Diğer hastalık tipi ise “Uzun Sürede Gelişen Diyare Tipi Sendrom” olarak bilinmekte olup daha geniş bir gıda grubu ile ilişkilidir. Bu gıdalar arasında; mısır ve mısır nişastası başta olmak üzere tahıl içeren gıdalar, patates püresi, sebzeler, kıyma, et ürünleri, puding ve çorbalar sayılabilir. Diyare yapıcı zehir olarak bilinen bu zehir, protein yapısında olup, tripsin ve pronaz enzimleri ile ısıya karşı duyarlıdır (Kaleli ve Özkaya, 2000; Güler, 2006; Tektemur, 2010). Nispeten daha hafif seyreden diyare tipi *B. cereus* gıda zehirlenmesinde inkübasyon süresi 8-16 saat arasında değişmekte olup, genelde 12-13 saattir. Hastalık 6-12 saat sürer ve belirtileri; bulantı (kusma çok seyrek), kramp şeklinde karın ağrısı ve sulu ishaldir. Genellikle ateş görülmez.

Bu tip *B. cereus* zehirlenmesi *C. perfringens* gıda zehirlenmesine benzerlik gösterir. Daha ağır seyreden emetik tip (kusma tipi) *B. cereus* gıda zehirlenmesinde ise inkübasyon süresi 1-6 saat arasında değişmekte olup, genel olarak 2-5 saattir. Bu zehirlenme şekli *S. aureus* gıda zehirlenmesine benzerlik göstermektedir (Anonymous, 2007a; Taş, 2008; Tektemur, 2010).

2.4. *Escherichia coli*'nin Genel Özellikleri ve Patojenitesi

E. coli, ilk kez 1895 yılında Alman pediatrist Dr. T. Escherich tarafından *Bacterium coli commune* adıyla tanımlanmıştır. *E. coli*, insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak kanalının normal florasında bulunur. Bu nedenle gıdalarda bulunması fekal bir bulaşmanın indikatörü olarak değerlendirilir (Erol, 2007).

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* familyasına ait, Gram negatif, laktoz negatif, sporsuz, çubuk şeklinde, fakültatif anaerob, hareketli bir bakteri olup, insan ve çoğu sıcak kanlı hayvanın doğal bağırsak florasında bulunmaktadır. *E. coli*, gıda mikrobiyolojisinde su ve çeşitli gıdalarda fekal kontaminasyonun indikatörü olarak önem taşımaktadır ve patojenik suşları, ishale yol açan enfeksiyonlar, idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, septisemi gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998; Anonymous, 2004a).

E. coli hastalık oluşturma mekanizmalarına göre altı grupta toplanmaktadır: Enterotoksijenik (ETEC), enteropatojenik (EPEC), enteroaggregatif (EaggEC), enterohemorajik (EHEC), enteroinvazif (EIEC) sulu ishale neden olan diffusely adherent-sulu ishal etkeni (DAEC). ETEC toksin etkisi ile hastalık yapmakta olup, ısıya dirençli (ST) ve ısıya duyarlı (LT) olmak üzere iki tür toksin üretmektedir. EPEC, özellikle bebeklerde ishale neden olmaktadır. İlk bulgular hafif kilo kaybı ve karın ağrısı olup hastalığın devamında huzursuzluk, beslenme güçlüğü ortaya çıkmaktadır. Dışkı; sulu, sarı-yeşil renklidir, kan ve mukus içermez. Tedavi edilmediği takdirde hastalık ilerler ve süresi uzayabilir. Bir yaşından sonra bebekler bu hastalığa karşı bağışıklık kazanmaktadırlar. EaggEC ise, seyahat ishallerinin nedeni olarak bilinmektedir. EIEC ise, shigellozise (*Shigella dysenteriae*) benzer bir hastalığa neden olmaktadır. Yani, bakteriler kolon epitel hücrelerine nüfuz ederek

ulserasyon ve kanlı ishale neden olurlar. Kanlı ve mukuslu ishal, ateş ve karın krampları tipik belirtileri olarak bilinmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998; Anonymous, 2004a; Taş, 2008). EHEC, karın kramplarıyla birlikte ishale neden olmaktadır. İshal hafif sulu bir ishal şeklinde olabileceği gibi kanlı ishal şeklinde de olabilmektedir. En yaygın serotipi *E. coli* O157:H7'dir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). A.B.D, FDA (Food and Drug Administration) tarafından, fekal oral bulaşmanın gıdanın ısıtılma tabi tutulması, çapraz kontaminasyonun engellenmesi, gıda sektöründe çalışanlar için eldiven kullanımı gibi koruyucu önlemler alınması, pastörizasyon, kişisel hijyen uygulamalarına dikkat edilmesi, çalışanlara hastalandıklarında tedavi imkanı sağlanması gibi önlemlerin önemi vurgulanmıştır (Madigan ve Martinko, 2006).

2.5. *Salmonella* Enteritidis'in Genel Özellikleri ve Patojenitesi

Enterobacteriaceae familyasına ait *Salmonella* cinsi bir bakteri olan *Salmonella* Enteritidis, aerob, Gram negatif , fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, enfeksiyon etkeni bir bakteridir (Anonymous, 2007b; Taş, 2008).

Tavuk eti, yumurta ve ürünlerinin tüketilmesiyle insanlarda zehirlenmelere neden olan *Salmonella* Enteritidis 1–3µm boyunda, 0.5–0.7µm eninde, uçları düz hafif yuvarlak, sporsuz, kapsülsüz basillerdir, anilin boyalarla kolayca boyanırlar. Sıvı besiyerlerinde homojen bulanıklık yaparak ürer, katı besiyerlerinde 24-48 saat içinde yuvarlak, düz kenarlı, kabarık, düzgün yüzeyli koloniler oluşturur. En uygun ortam asiditesi pH 7.4 olup pH: 3,8- 9,5 gibi geniş bir aralıkta canlılıklarını da koruyabilmektedir. Enfeksiyonun insanlara bulaşmasında *S. Enteritidis* ile kontamine tavuk et ve yumurtaları önemli bir rol oynamaktadır (De Jong ve ark, 2006; Kalender ve Şen, 2008). Optimum gelişme sıcaklığı 5,2– 46,2 °C olup, yüksek su aktivitesine (0,98) sahip gıdalarda ısıtılma işlemi ile kolaylıkla inaktive olabilmektedir. Ancak düşük su aktivitesine sahip, yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda daha yüksek sıcaklıklar gerekebilmektedir. Çiğ veya yeterince ısıtılma uygulanmamış yumurtalar ile tavuk, hindi gibi kanatlı et ürünleri *Salmonella* Enteritidis'in sıklıkla izole edildikleri

gıdalar arasındadır (Smith-Palmer ve ark, 2001; Anonymous, 2007b; Köseahmetoğlu, 2011).

Türkiye'de farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda tavuk etleri ve tavuklardan en fazla izole edilen *Salmonella* türü *S. Enteritidis*'dir (Kılınç ve Aydın, 2006; Kalender ve Şen, 2008). *Salmonella* insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde yer almasına rağmen, gıdalara da dışkı ile bulaşmış diğer kaynaklardan bulaşabilir. *Salmonella* zehirlenmelerinin %72'si et, tavuk ve yumurta aracılığı ile olmaktadır (Anonymous, 2006).

Zehirlenme belirtileri baş dönmesi, mide ağrısı, kusma, ani ishal ve ateş ile kendini gösterip zehirlenme şiddeti ise tüketilen gıdanın miktarına, gıda ile alınan *Salmonella* sayısına ve kişinin direncine bağlı olarak 2-7 gün olduğu, bazı vakaların ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir (Anonymous, 2006).

2.6. Bakteriyosinler

2.6.1. Bakteriyosinlerin Tanımı ve Genel Özellikleri

Bakteriyosinler; çeşitli laktik asit bakterileri tarafından ribozomal olarak sentezlenen yakın akraba türler üzerine etkili, hücrelerdeki reseptörlere bağlanan ve üretimi büyük oranda pilazmit DNA tarafından kodlanan peptit ya da protein yapısındaki bileşiklerdir (Okereke ve Motville 1991; Kurt ve Zorba, 2005). Yapılan çalışmalarda antimikrobiyal spektrumu geniş, özellikle gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakteriler üzerinde etkili bakteriyosinlerin bulunmasıyla birlikte bu tanım genişletilmiştir (Bilgin, 2008).

Bakteriyosinler, genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitlerdir. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Bakteriyosinler biyokimyasal özellikleri, molekül ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik dayanakları bakımından heterojen büyük bir sınıf oluştururlar (Chen ve Hoover, 2003; Gillor ve ark, 2008; Asutay, 2007).

Bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesi antibiyotiklerin ise çoklu enzim kompleksleri ile sekonder metabolit olarak sentezlenmesi onları ayıran en önemli özelliktir. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler;

- Fermente gıda ve yem üretiminde kullanılan ticari öneme sahip ve insan kullanımı için genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) bir çok LAB (örneğin; laktokoklar, laktobasiller ve pediokoklar) tarafından üretilmektedir,
- Ökaryotik hücrelere toksik değildirler,
- Antimikrobiyel spektrumları, Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlere göre daha geniştir.
- Bazı bakteriyosinler, gıda patojenleri de dahil olmak üzere, tek bir hedef patojene yönelik aktivite göstermektedirler (Nes ve ark, 2007).

Birçok kaynakta bakteriyosinler ve antibiyotikler karıştırılmaktadır. Günümüz sınıflandırılmasında bakteriyosinler antibiyotiklerden tamamen farklı moleküller olarak kabul edilmektedir. Temel farklılıklara bakıldığında;

- ✓ Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilirken, antibiyotikler gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes ve ark, 2002).
- ✓ Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler enzimatik bir işlenme sonucu aktif hale geçmektedirler. Bakteriyosinler pre-peptitler olarak sentezlenmekte daha sonra posttranslasyonel işlemlerle N-terminal lider peptitin uzaklaştırılmasıyla aktif form olan olgun bakteriyosinlere dönüşmektedirler.
- ✓ Üretici hücreler kendi bakteriyosinlerine karşı genetik olarak bağışıklık kazanmışlardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler bakteriyosinin yapısal genleriyle bağlantılı olup, antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik belirleyiciler yapısal antibiyotik genleriyle bağlantılı değildir.

2.6.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, aminoasit dizilimleri, etki mekanizmaları, biyolojik aktiviteleri, ısı toleransları, modifiye aminoasit varlıkları ve salgı mekanizmaları göz önünde bulundurularak sınıflandırılır. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler dört farklı grup altında sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1)(Klaenhammer, 1993; Heng ve Tagg, 2006; Akkoç ve ark, 2009; Ghamat, 2010). Ancak, biyokimyasal tanımlanması bakımından ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (Chen ve Hoover, 2003; Akkoç ve ark, 2009).

GRUP I bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler genellikle “lantiyonin” içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Lantibiyotiklerin yapılarında lantiyonin (Lan) ve metillantiyonin (Me-Lan) olarak adlandırılan türev amino asitlerin bulunuşu karakteristiktir. Ayrıca bu grup üyelerinde, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi, dehidro amino asitler de bulunmaktadır (Twomey ve ark, 2002). Bu grupta yer alan nisin, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C, ısı stabil biyomoleküllerdir (Chen ve Hoover 2003). Grup Ia lantibiyotikler katyonik, lineer ve düzgün olmayan şekillidirler. Bu grup üyesi lantibiyotikler, hedef hücre membranlarında porlar oluşturur ve membran potansiyelini bozarak duyarlı bakterileri inhibe etmektedirler (Reunanen, 2007; Todorov, 2009). Nisin, bu alt grubun en önemli üyesidir ve pek çok patojen ve gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterir (Chen ve Hoover 2003; Deraz ve ark, 2005).

IB alt grubundakiler ise; genellikle yüksüz ya da negatif yüke sahip bakteriyosinler bu grupta yer almaktadır. Globüler peptit yapısı içerirler. Belirli bakteriyel enzimleri ya da enzim sistemlerini inhibe ederek antimikrobiyel aktivite göstermektedirler (Twomey ve ark, 2002). Bu grup lantibiyotiklerden bazıları mersasidin, sinnamisindir (Dinçer ve ark, 2009; Akkoç ve ark, 2009).

GRUP II bakteriyosinler: Genelde ısı stabil ve translayon sonrasında modifiye olmayan bakteriyosinleri içeren oldukça geniş bir gruptur. Antimikrobiyel aktiviteleri, membran aktif molekül yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu gruptaki bazı bakteriyosinler 100°C’den 121°C’ye kadar olan sıcaklıklara karşı

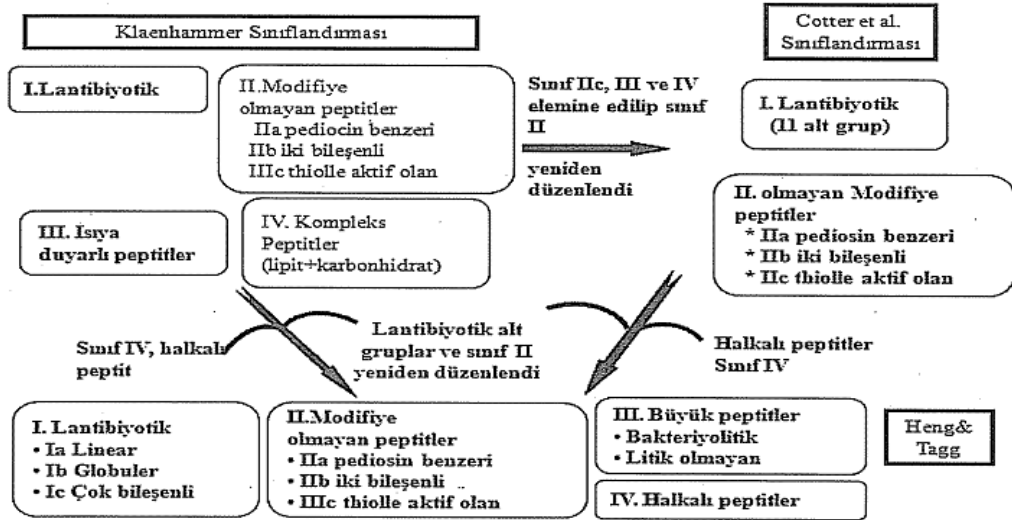
stabildirler (De Martinis ve ark, 2002). Bu bakteriyosinler grup IIa, grup IIb ve grup IIc olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır. Grup IIa üyesi bakteriyosinler, *Listeria* türlerine karşı aktivite gösteren pediosin benzeri bakteriyosinlerdir. Pediosin PA-1 bu grubun en önemli temsilcisidir. Grup IIb bakteriyosinler, iki peptit içerirler. Tam aktivite gösterebilmeleri için bu iki peptide birden ihtiyaçları vardır. Bu bakteriyosinler hedef hücre zarında por yapısı oluştururlar ve tam aktivite gösterebilmek için iki peptide de ihtiyaç duymaktadırlar. Bu peptidler tek olduğunda zayıf aktivite gösterirken, iki peptid bir arada olduklarında sinerjetik etkileşim sonucu oldukça aktif moleküller haline gelmektedirler. Bu gruptaki bazı önemli bakteriyosinler, enterosin L50A ve L50B, laktokoksin G ve M/N, plantarisin EF ve JK'dir (Kurt ve Zorba, 2005; Köseoğlu, 2007; Akkoç ve ark, 2009). Bir diğer alt grup ise salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitler olan grup IIc bakteriyosinleri siklik bakteriyosinlerdir (Guder ve ark, 2000; Akkoç ve ark, 2009).

GRUP III bakteriyosinler: Yüksek molekül ağırlığına sahip ve ısıya dayanıksız proteinlerden oluşan bu grup; bakteriyolizinler olarak da adlandırılırlar. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Helvetisin J, laktisin A, laktisin B, helvetisin V-1829 ve enterolisin A bu grubun en bilinen üyelerindendir (Klaenhammer, 1993; Ennahar ve ark, 2000; Trotter ve ark, 2004).

GRUP IV bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler ise, büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar (Kurt ve Zorba, 2005). Plantarasin S, laktosin 27, leukonosin S ve lakstrepsin bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Ennahar ve ark, 2000; Nes ve Holo, 2000; Akkoç ve ark, 2009).

Klaenhammer (1993) bu yaygın kabul gören 3 grubun dışında 4. bir grup daha önermiştir. Bu grup glikoprotein veya lipoprotein yapısında kompleks bakteriyosinlerdir. Glikoprotein yapısında olan Lactocin 27 veya lipo-protein yapısında olan Lacstrepcinler bu gruba dahildir. Yine de bu bakteriyosinler henüz tam olarak saflaştırılmamıştır. Bu grupta yer aldığı düşünülen bakteriyosinlerin katyonik ve hidrofobik özellikleri nedeniyle diğer makromoleküllerle kompleksler oluşturma eğilimine sahip oldukları ve bu nedenle bu kompleks bakteriyosinlerin

aslında bir kalıntı olabilecekleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Kemperman tarafından yeni bir sınıflandırma modeli daha önerilmiştir. Cotter ve ark (2005) daha radikal bir düzenleme önermiştir. Klaenhammer'ın ilk iki sınıfını (lantibiyotikler ile lanthionine içermeyen bakteriyosinler) büyük ölçüde kabul etmiş, sınıf III' e litik etkilerinden ötürü bakteriyolisinler demiş, sınıf IV'ü ise reddetmiştir. Ayrıca Kemperman'ın sınıf V'ini sınıf IIc olarak ele almıştır. Sınıf IId adında yeni bir sınıf daha oluşturmuş ve lanthionine içermeyen ve sınıflandırılmayan bakteriyosinleri bu gruba dahil etmiştir. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması hala tartışılan bir konu olmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması (Heng ve Tagg, 2006)

Enterococcuslar'ın ürettiği bakteriyosinler enterosin olarak adlandırılmaktadır. Bugüne kadar tespit edilen enterosinlerin sınıf I, sınıf II (a ve c grubu) ve sınıf III bakteriyosinlerinin özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir. *E. faecalis*'in ürettiği iki bileşenli sitolisin sınıf I; *E. faecium* tarafından üretilen enterosin A, enterosin P ve enterosin CRL35; *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosin 31 ve *E. mundtii* tarafından üretilen mundtisins sınıf IIa' ya ve *E. faecalis*'in ürettiği enterosin AS-48, enterosin 1071A ve 1071B, *E. faecium*' un ürettiği enterosin B, enterosin L50A ve L50B ve enterosin Q sınıf IIc'ye örnek olarak verilebilir (Moreno ve ark, 2003; Vilas, 2011). *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının

ürettikleri enterosinler, diğer bakteriyosinlere göre daha iyi fizikokimyasal özellik ve biyolojik aktivite gösterdikleri için, teknolojik önemi bulunmaktadır (Park ve ark, 2003; Moreno ve ark, 2003). *Enterococcus faecium*'un ürettiği bakteriosinler, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. ve diğer Gram pozitif patojenik bakteriler ile gıda bozulması yapan bakterilere karşı inhibitör etki gösteren antimikrobiyel peptid ve proteinlerdir (Hugas ve ark, 2003; Saavedra ve ark, 2003).

E. faecalis suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin sınıflandırılmaları ve bazı özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

Tip 1: *E. faecalis* DS16'dan sitolisin (bakteriyosin/hemolizin). Bu 2 bileşenli lantibiyotik, hem hemolisin hem de bakteriyosin aktivitesi gösterir.

Tip 2: *E. faecalis* S-48'den siklik peptid antibiyotik AS-48 (enterosin AS-48). Bu bileşik hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. *E. faecalis* INIA 4 tarafından üretilen enterosin 4 ise, sadece Gram pozitif bakterilere etkilidir.

Tip 3: Dar antimikrobiyel spektrum ile *E. faecalis* YI17'den bakteriyosin 31.

Tip 4: *E. faecalis* BEF 1071'den enterosin 1071A ve enterosin 1071B. Bu enterosinler, Tip 2'den daha dar bir aktivite spektrumu ve *E. faecalis* tarafından üretilen Tip 3 enterosinlerden de geniş aktivite spektrumu gösterirler (Vilas, 2011).

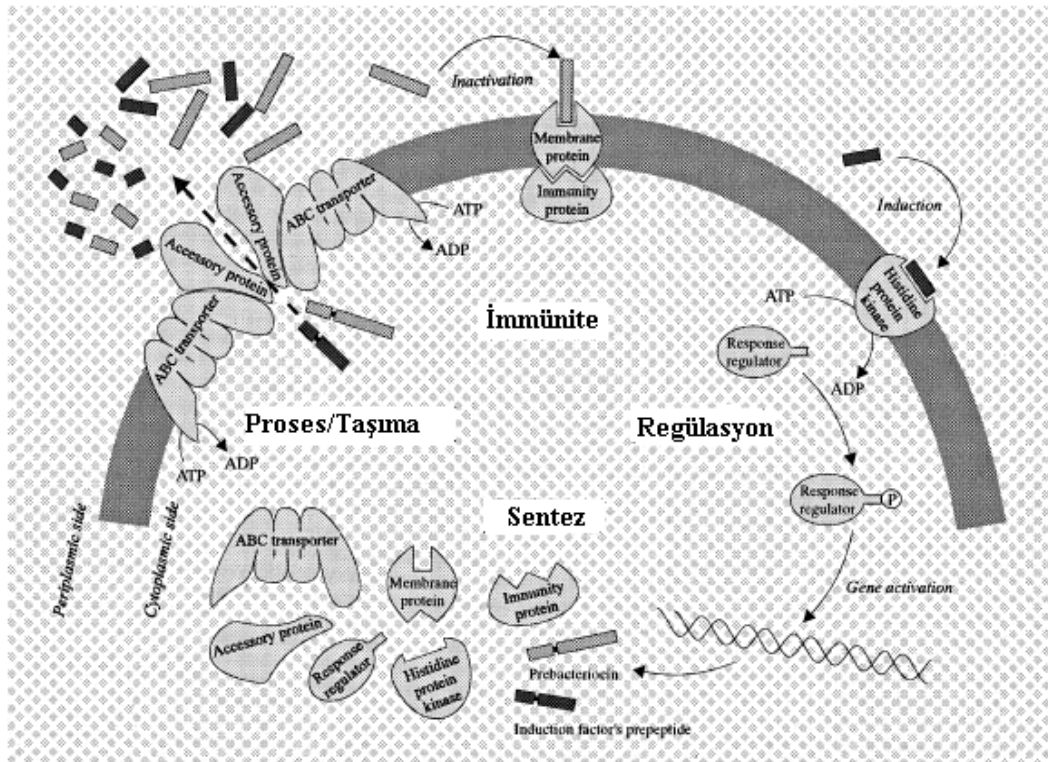
2.6.3. Bakteriyosinlerin Biyosentezleri

LAB'lerin bakteriyosinleri, ribozomal olarak sentezlenmektedir. Bakteriyosin üretimi ile immüniteyi kodlayan genler, plazmid, kromozom ve transposon üzerinde bulunabilmektedir. Birçok bakteriyosinin yapısal genleri operona benzer bir yapı gösterir. Bakteriyosinlerin üretiminin gerçekleştirilebilmesi için dört farklı gene ihtiyaç vardır: (i) prepeptiti kodlayan bir yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC-taşıyıcısını kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu ve ark, 2002; Deegan ve ark, 2006).

Her üç sınıf bakteriyosinlerin sentezi biyosentez mekanizması açısından değerlendirildiğinde birbirine benzemektedir. Sadece sınıf I bakteriyosinlerin

biyosentezinde bulunan anormal aminoasitlerin üretim aşaması olan kimyasal modifikasyon (posttranslasyon) sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin sentezinde yer almamaktadır. Sınıf I bakteriyosinleri prelantibiyotik (prebakteriyosin) olarak sentezlendikten sonra dehidrasyon ve çapraz bağlanma (kimyasal modifikasyon) reaksiyonlarına uğramakta ve bunun sonucunda anormal aminoasitler (lantibiyotikler, dehidreaminoasitler vb.) oluşmaktadır. Sınıf II ve sınıf III bakteriyosinleri kimyasal modifikasyona uğramadıkları için anormal aminoasitleri içermemektedirler (Savadogo ve ark, 2006; Asutay, 2007; Bilgin, 2008).

Bakteriyosinlerin biyosentezinde üç bileşenli regülasyon sistemi rol oynamakta olup, bunlar histidin protein kinaz enzimi, respons regülörü ve indüksiyon faktörüdür. İndüksiyon faktörü membranda bulunan histidin protein kinaz enzimini uyarır. Daha sonra histidin protein kinaz enzimi sitoplazmada bulunan respons regülörünü fosforilize ederek bu uyarıyı hücreye iletir ve biyosentezin başlamasını sağlar (Montville ve Winkowski, 1997; İşleroğlu ve ark, 2005; Bilgin, 2008). Şekil 2.2’de bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezlerinin şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Bakteriyosinlerin regülasyonu ve biyosentezleri (Asutay, 2007).

Yapısal gen bir prebakteriyosin (prepeptit) olarak kodlanmaktadır. Prebakteriyosinler biyolojik olarak inaktif olup N-terminalinde lider peptit ve C-terminalinde propeptit içermektedirler. Prebakteriyosinin olgunlaşması veya taşınması sırasında N-terminal uzantısı enzim vasıtasıyla parçalanıp uzaklaşmakta ve böylece aktif hale geçmektedirler (Bilgin, 2008).

Bakteriyosinler hücre içinde sentezlendikten sonra, aktivitelerini gösterecekleri bölgelere, hücre dışına taşınmaktadır. Sentezlenen bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması membrana bağlı olan iki protein tarafından gerçekleştirilir. Bunlar ABC-transporter ve aksesuar proteinidir. ABC-taşıyıcısı prebakteriyosinin taşınmasında rol oynamaktadır. Ayrıca proteolitik aktiviteye sahip olduğundan prepeptidin lider dizisini parçalama fonksiyonuna da sahiptir. Sonuçta lider peptit uzaklaşmakta ve olgun bakteriyosin sitoplazmik membrandan dışarıya taşınmaktadır. Aksesuar proteinleri ise membran translokasyonunu teşvik etmekte ve bakteriyosinlerin taşınmasında rol oynamaktadır (Klaenhammer, 1993; Rodriguez ve ark, 2003; Bilgin, 2008; Türemiş, 2012).

2.6.4. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları

Bakteriyosinler duyarlı bakterilerin sitoplazmik membranına etki gösteren peptitlerdir. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girerler ve zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar (Asutay, 2007; Türemiş, 2012).

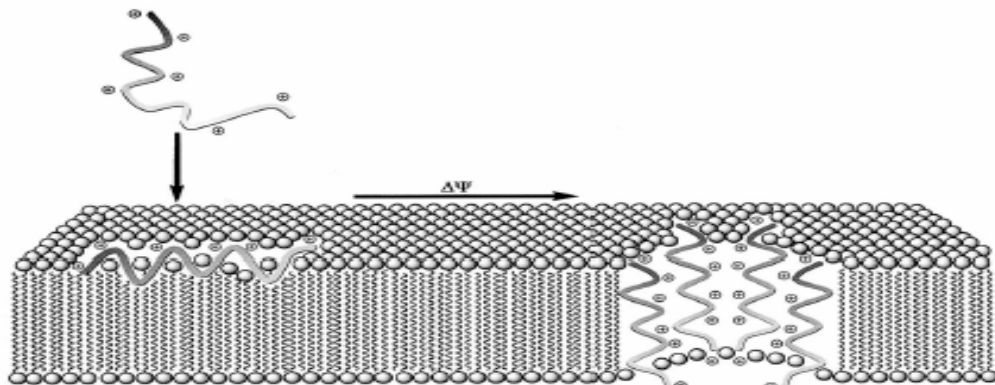
Duyarlı bakterilerin hücre membranında porlar oluşturarak membran geçirgenliğini değiştirir. Buna bağlı olarak hedef hücreden K^+ iyonu ve ATP bileşiklerinin sızmasına neden olurlar. Bunun sonucunda transmembran potansiyeli ve pH gradyentinin kısmen veya tamamen yok olması ile proton itici gücü (PMF) ortadan kalkmaktadır. PMF, hücre içinde iyonların ve metabolitlerin birikmesi ile ATP sentezi gibi sitoplazmik membranda enerjiye bağlı birçok hayati işlemleri yürütmektedir. PMF'nin yok olması veya bozulması ATP'nin kaybına, besin maddelerinin aktif transportla taşınamamasına, hücre içi pH değerinin korunmasında rol oynayan K^+ ve kofaktör olarak rol oynayan Mg^{2+} iyonlarının hücre dışına akışına

ve duyarlı bakterinin enerji rezervlerinin tükenmesine yol açar. Buna paralel olarak DNA, RNA ve protein gibi makromoleküllerin sentezi azalarak bakterilerin inhibisyonuna sebep olmaktadır (Bauer and Dicks, 2005; Akkoç ve ark, 2009; Türemiş, 2012).

Bakteriyosinler, katyonik bir molekül olduğu için, sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında, sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle, ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu, bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır. Böylece, hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek, gözenek oluşumuna yol açmaktadır (Twomey ve ark, 2002).

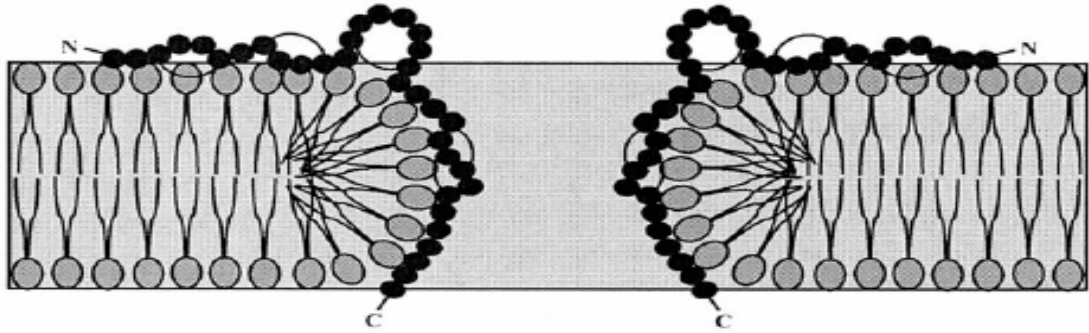
Bakteriyosinlerin duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranında por oluşturmaları “Barrel-Stave”, “Wedge-Model” ve “Lipit Model” olmak üzere 3 model ile açıklanabilir.

Barrel-Stave mekanizması ile membranda por oluşumu bakteriyosinlerin katyonik yük taşıyan C-terminali fosfolipitlerin baş grupları ile elektrostatik interaksiyona girmesi ile açıklanabilir (Şekil 2.3). Membran potansiyeli varlığında membran içine girerek oligomerize olmakta ve mebranda iyonik por oluşturmaktadır. Peptitler merkezi kanalın etrafına dizilmekte ve hidrofobik yüzeyler membrana doğru, hidrofilik yüzeyler ise porun merkezine doğru yönelmektedir (Mc Auliffe ve ark, 2001; Kopenon, 2004)



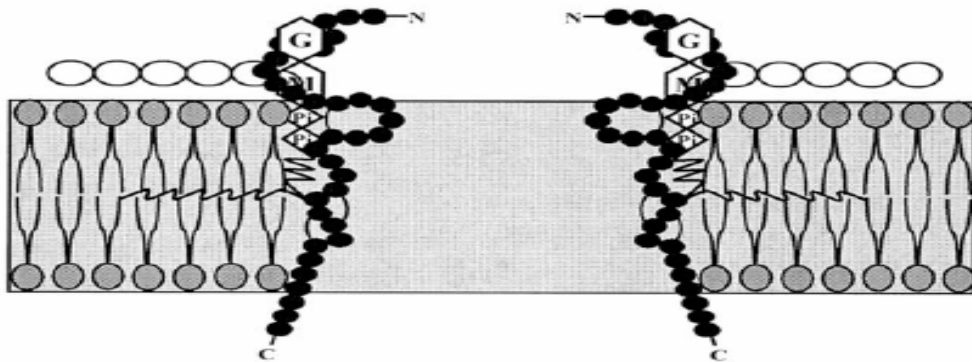
Şekil 2.3. Barrel-stave mekanizması ile por oluşumu (Mc Auliffe ve ark, 2001; Kopenon, 2004)

İkinci model olan Wedge modelinde de, bakteriyosinlerin pozitif yüklü C-terminali anyonik fosfolipitlerle elektrostatik olarak interaksyona girip membran yüzeyine sıkıcı tutunmakta ve lipit dinamiğinin bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 2.4). Bakteriyosin molekülleri anyonik fosfolipitlerle interaksyon halindeyken membran içine girerek membranda bükülmelere ve dolayısıyla porların oluşmasına yol açmaktadır (Kopenon, 2004; Bauer ve Dicks, 2005).



Şekil 2.4. Wedge-Model ile por oluşumu (Kopenon, 2004; Bauer ve Dicks, 2005)

Lipit II modeline göre por oluşumunda ise bir peptidoglukan prekürsörü olan lipit II önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Bu modelde bakteriyosin ilk olarak 1:1 oranında lipit II nin karbonhidrat kısmına bağlanmaktadır. Bakteriyosinin N-terminal kısmı bu bağlanmada rol oynamakta ve negatif bir yüzey gerekmemektedir. Lantibiyotiğin C-terminali membran içine girip membranın karşı tarafına geçmektedir. Por oluşumu için birkaç bakteriyosin/lipit II kompleksi gereklidir (Şekil 2.5) (Kopenon, 2004; Bauer ve Dicks, 2005).



Şekil 2.5. Lipit II model mekanizması ile por oluşumu (Kopenon, 2004; Bauer ve Dicks, 2005)

LAB'nin ürettikleri bakteriyosinler genellikle Gram-pozitif bakterileri üzerinde inhibitör aktivite gösterirler. Birçok LAB bakteriyosinleri, gıdalarda bozulma ve hastalık etmeni bakteriler örneğin *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium botulinum* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Gram negatif bakteriler, dış membranlarından dolayı antimikrobiyal maddelere karşı daha az geçirgen olduklarından, söz konusu bakteriler ısı ve donma işlemlerine maruz bırakıldıkları zaman, bakteriyosinlere karşı duyarlı hale geldikleri bildirilmiştir (Galvez ve ark, 2007). Az sayıda da olsa yapılan çalışmalar da Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bakteriyosinler de tespit edilmiştir. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*'un bazı suşlarının üretmiş olduğu bakteriyosinlerin, Gram pozitif bakterilerin yanı sıra, Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir (Cotter ve ark, 2005; Kurt ve Zorba, 2005; Asutay, 2007; Türemiş, 2012).

2.6.5. Bakteriyosinlerin Üretimi, Antimikrobiyel Aktiviteleri ve Stabilitelerini Etkileyen Faktörler

Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi; besiyerinin bileşimi, üretici bakterinin gelişme fazı, besiyeri başlangıç pH'sı, fermantasyon şekli (kesikli ve sürekli) ve inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısıl işlem, proteolitik enzimler ve depolama koşullarına bağlıdır (Asutay, 2007; Türemiş, 2012). Kullanılan besiyerindeki bazı bileşiklerin (laktoz, maya ekstraktı, tampon madde vb.) bakteriyosin aktivitesini korumakta ve artırmaktadır. Bakterilerin gelişmesi için gereken en uygun sıcaklık ve pH değeri genellikle bakteriyosin üretimi için optimum değerdir. Bazı bakteriyosinler gelişme sıcaklığının biraz altındaki derecelerde daha fazla miktarda üretilmektedir. Ancak optimum sıcaklığın çok altında veya üstünde ve inkübasyon süresinin uzatılmasıyla bakteriyosin aktivitesi azalmaktadır. Inkübasyon süresi uzamasıyla bakteriyosin aktivitesinin azalmasının nedeni artan asitlik ile birlikte bakteri tarafından salgılanan veya lize olan bakterilerden açığa çıkan ekstraselüler ve intraselüler proteazlardır (Yıldırım ve Yıldırım, 2000; Todorov and Dicks, 2005b).

Bakteriyosinlerin kullanımını sınırlayan bazı faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörler; dar aktivite spektrumu, kendiliğinden bakteriyojenikliğin kaybı, proteolitik enzimlerle inaktivasyon, gıda ortamlarına kültürün zayıf adaptasyonu, düşük üretim seviyesi ve bakteriyosine dayanıklı bakterilerin ortaya çıkmasıdır (Seçkin ve Baladura, 2010).

Bakteriyosin üreten mikroorganizmaların veya direk olarak bu kültürlerin ürettiği bakteriyosinlerin, gıda sanayinde kullanımlarını sınırlayan faktörlerin başında;

- ✓ Bakterinin adaptasyonu,
- ✓ Ürüne ait faktörler,
- ✓ Hedef bakterinin dayanıklılığı ve rekabet gücü,
- ✓ Yöntem parametrelerine duyarlılık,
- ✓ Metabolik aktivite,
- ✓ Gıda sistemindeki gereklilikler (İnaktivasyon riski),
- ✓ Duyusal özelliklere muhtemel olumsuz etkiler,
- ✓ Aktivite spektrumu,
- ✓ İnhibitörler (Spesifik proteazlar vs),
- ✓ Katı materyalde difüzyonun sınırlı olması,
- ✓ Dirençlilik gelişimi, gıda bileşenleriyle spesifik olmayan bağlanma (lipitlerin neden olabileceği inaktivasyon) şeklinde sıralanabilmektedir.

Bakteriyosinlerin gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, onların sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Ayrıca, bazı bakteriyosinler Gram negatif bakterilere karşı aktif değildir. Bakteriyosinlerin, çok faktörlü bir sistemin parçası olarak kullanılması, daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Gıda güvenliğinin sağlanmasında, birden fazla antimikrobiyel faktörün bir arada kullanılması sonucu, sinerjistik bir etkinin ortaya çıkmasına “Hurdle Etkisi” (veya engeller teknolojisi) denilmektedir (Cleveland ve ark, 2001; Chen ve Hoover, 2003). Bu kombine yöntemlerle, gıdaların muhafazasında tek başına yeterli olamayan bir çok faktör (sıcaklık, su aktivitesi, pH, oksidasyon/

redüksiyon potansiyeli, farklı antimikrobiyel maddeler) bir araya getirilerek, bunların etkileşimleri sonucu kümülatif bir etki yaratılmaktadır.

LAB'lerinde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriyosin, bazı *L. lactis* spp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, aralarında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* cinslerinin de dahil olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Ancak Gram negatif bakterilere karşı etkili değildir. Dış membranını uzaklaştırılmış veya zarar görmüş (EDTA ile muamele edilmiş, ısı şoku veya soğuk şoka uğramış Gram-negatifler) üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Liu ve Hansen, 1990; Hauben ve ark, 1996).

Bakteriyosinler özellikle Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olmalarına rağmen Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde fazla etkili olamamaktadır. Dolayısıyla Gram negatif olan patojen mikroorganizmaların da olduğu düşünüldüğünde sadece bakteriyosin kullanımıyla gıdaların güvenliğinin sağlanamayacağı nettir. Bu sebeple, bakteriyosinle birlikte diğer koruyucu katkıların veya proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram negatif bakterilerin dış zarlarının stabilitesi bozulduğunda bakteriyosinlere karşı hassasiyet göstermektedirler. Böylelikle bakteriyosinle birlikte hücre zarını bozabilecek trisodyum fosfat veya EDTA gibi şelatlayıcı ajanların kullanılmasının inhibisyon etkisi yapabileceği bildirilmiştir. EDTA, Gram negatif mikroorganizmaların lipopolisakkarit kısmında Mg^{+2} iyonuna bağlanarak dış zarın yapısını bozup, bakteriyosinin sitoplazmik zara ulaşmasını sağlamaktadır (Biler, 2009; Türemiş, 2012).

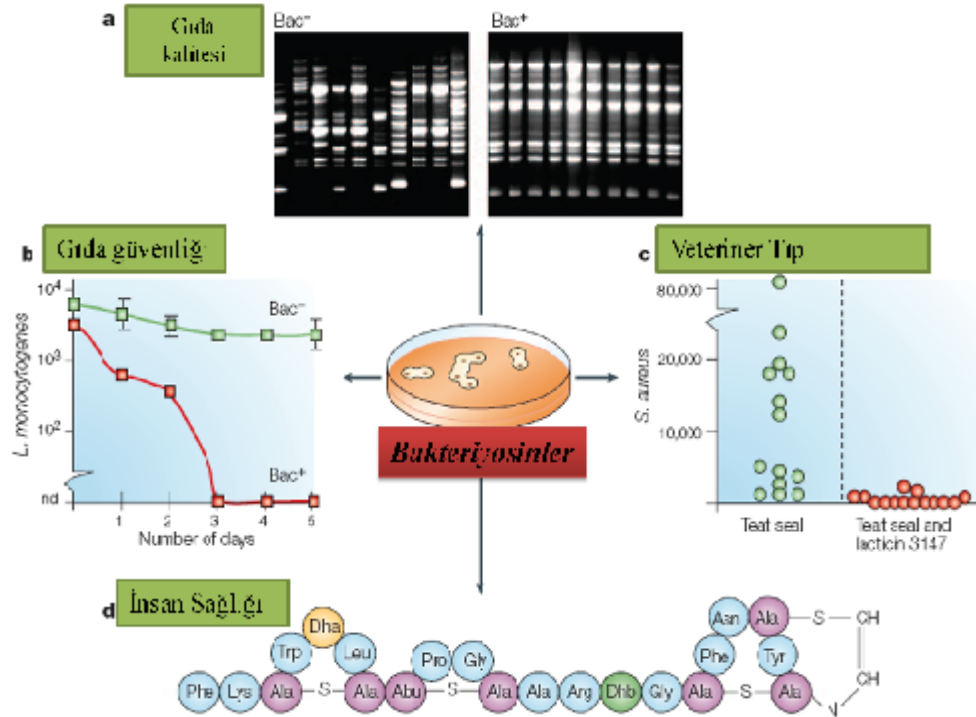
Bakteriyosinlerin uygulamalarındaki sınırlar bazı nedenlere dayanmaktadır:

- ✓ Pek çok bakteriyosinde bulunan dar spektrum aralığı,
- ✓ Suşlardaki zayıf bakteriyosin üretimi,
- ✓ Yapı ve fonksiyon hakkındaki yetersiz bilgi,
- ✓ Bakteriyosinlerin insan sindirim sistemi florasında oluşturacağı etkilerin tam olarak aydınlatılmamış olması,

- ✓ Gıda maddesi içinde bakteriyosinlerin nasıl davranacağını bilinmemesi (Moncheva ve ark, 2001).

2.6.6. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

Bakteriyosinler, gıda güvenliğinde, klinikte, veteriner tıpta, bitki hastalıklarının kontrolünde ve antitümör araştırmalarında kullanılmaktadır. Özellikle son yıllar gıda koruyucusu olarak kullanım açısından ilgi odağı olmuştur (Dinçer ve ark, 2009).



Şekil 2.6. Bakteriyosinlerin kullanım alanları (Cotter ve ark, 2005)

2.6.6.1. Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı

Bakteriyosinlerin veya bakteriyosin üreten türlerin gıdalarda kullanımı üzerindeki çalışmalar hammaddeye, proses koşullarına, dağıtıma, tüketime veya gıdanın çeşidine bağlı olarak gıda bozulmalarının, patojenlerin ya da bozulma yapan

bakterilerin bulunabildiği birçok alan üzerinde yoğunlaşmıştır (Galvez ve ark., 2008).

Gıda üreticileri için en büyük avantaj güvenli ve uzun raf ömrüne sahip gıdaların üretilmesi iken, tüketiciler kimyasal koruyucuları içermeyen ve az işlem görmüş gıdaları tercih etmektedirler. Bakteriyosinler, gıdalarda tüketimleri güvenli olan bakteriler (GRAS) tarafından üretildikleri ve az işlem görmüş gıdalarda dahi patojen ve bozulma etmeni organizmalara karşı etkili oldukları için bu isteklere hizmet etmektedir (Akkoç ve ark, 2009). Sıcaklığın zararlı olacağı şartlar altında ekstra koruma sağlayarak gıda zinciri boyunca, gıda kaynaklı patojenlerin bulaşma riskini de azaltmaktadır. Bakteriyosinler sayesinde, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıplar azalmakta ve kimyasal koruyucular daha az kullanılmaktadır (Başbülül, 2009).

Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyel aktivitelerinin yanı sıra; doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptit veya protein yapısında olmaları ise; pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda kolaylıkla sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması, bu bakteriyosinlerin yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Hatta bazı bakteriyosinler, otoklav sıcaklığında bile stabil kalabilmektedirler. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır (De Martinis ve ark, 2002; Doğan, 2009).

Gıdalarda bakteriyosinlerden yararlanma şekilleri farklı olabilir. Bakteriyosinler, doğrudan gıda maddesine eklenebilirler. Bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürler gıdaya inoküle edilebilirler. Bakteriyosinlerin kullanımı gıdanın koruyucu ambalaj materyali ile birlikte olabilir. Sonuçta; uygun olan bakteriyosinin veya uygun olan bakteriyosini üreten laktik asit bakterisinin gıdaya eklenmesi; hem gıdanın raf ömrünü uzatacak hem de gıda sağlıklı kabul edilecektir. Bu amacın gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak olan bakteriyosin molekülünün iyi bir şekilde tanımlanıp saflaştırılması gerekmektedir. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri Çizelge 2.1’de verilmiştir (Cleveland ve ark, 2001; Biler, 2009).

Koruyucu kültür olarak, daha çok laktik asit bakterileri yaygın olarak kullanılırken, bakteriyosin olarak, yasal kullanımına izin verilen nisin kullanılmaktadır. Nisin, gıda işleme sırasında ve fermantasyonlarda ticari olarak kullanılan ve GRAS olarak kabul edilen ilk bakteriyosindir. Nisinin etki spektrumu, diğer birçok bakteriyosine kıyasla, daha geniş olup, asidik gıdalarda ve Gram pozitif bakteriler üzerine kuvvetli inhibisyon etki gösterirler. Nisin, düşük pH'ya dayanıklı ve vejetatif hücrelerin yanı sıra, bakteriyel endosporlara karşı da etkilidir (De Martinis ve ark, 2002; Chen ve Hoover, 2003).

Gıdalarda kullanılacak olan bakteriyosini üreten suşların seçiminde bazı özelliklerin aranması gerekmektedir. Bunlar;

- Tüketicilerin bu konudaki endişelerinin giderilmesi amacıyla üretici suş tercihen GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir kabul edilen özelliklere sahip) olmalıdır.
- Bakteriyosin *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum* gibi patojenlerin dahil olduğu geniş bir aktivite spektrumuna sahip olmalıdır.
- Bakteriyosinlerin, tüketici sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olması istenmemektedir. Gıda güvenliği açısından risk taşımamalıdır.
- Bakteriyosinlerin ilave olunan üründe aroma bileşenlerinin geliştirilmesi gibi yararlı etkileri olmalıdır.
- Bakteriyosin ısıya dirençli olmalıdır (Horn ve ark, 2004; Biler, 2009; Türemiş, 2012).

Çizelge 2.1. Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar (Garneau ve ark, 2002; Asutay, 2007; Biler, 2009)

Bakteriyosin	Uygulanan gıda	Etkileri
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri	Bakteriyel inaktivasyon
Nisin A	Ricotta peynirinde <i>Listeria monocytogenes</i> 'in kontrolü için kullanılmıştır.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir.	<i>L. monocytogenes</i> 'in gelişimi engellenmiştir.
Enterocin 4	Enterocin sentezleyen <i>Enterococcus faecalis</i> INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> Ohio'yu inhibe ederken, <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A'yı inhibe etmemiştir.
Piscicolin 126	Jambonda <i>L.monocytogenes</i> kontrolü için kullanılmıştır.	Ticari bakteriyosinden daha etkili bulunmuştur.
Leucocin A	<i>Leuconostoc gelidium</i> UAL 187 vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır.	<i>Lactobacillus sake</i> 'in etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir.
Lactocin 705	Kıyılmış sığır etinde <i>Listeria monocytogenes</i> 'in gelişimini önlemek için kullanılmıştır.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'in kıyılmış etlerde gelişimini önlemiştir.
Pediocin AcH	Tavuk eti sosisinde <i>Listeria monocytogenes</i> 'i inhibe etmek için pediocin üreten <i>Pediococcus acidilactici</i> kullanılmıştır.	Etkili bir şekilde <i>L. monocytogenes</i> sayısını azaltmıştır
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır.	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir.
Pediocin AcH	Tavuk etine pediocin preparatı ilave edilmiştir.	5 °C'de 28 gün <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir.
Pediocin PA-1	Fermente sosiste starter olarak <i>Pediococcus acidilactici</i> kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> 'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir.
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk göğsü eti ve sosiste kullanılmıştır.	Çeşitli şartlar altında <i>Listeria monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir.

2.6.6.2. Bakteriyosinlerin klinik kullanım alanları

Antibiyotiğe dirençli patojenik bakterilerde ve birçok kimyasal koruyucunun neden olduğu istenilmeyen yan etkilerde belirgin bir yükseliş olması nedeniyle yeni antimikrobiyel ajanların gelişmesi oldukça önem kazanmıştır. Enfeksiyon tedavisi için ilaçlarda ve gıda katkı maddesi olarak yemlerde koruyucu olarak kullanılmaları, gelişmeye devam eden bakteriyosinlere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır. Pek çok bakteriyosin, antimikrobiyel aktivitelerini antibiyotik ve koruyuculardan tamamen farklı bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu nedenle bazı durumlarda antibiyotik ve koruyuculara tamamlayıcı olarak kullanılmaktadırlar (Gillor ve ark, 2005; Başbülül, 2009).

Bakteriyosinlerin gıda koruma amaçlı kullanımı dışında farklı alanlardaki kullanım olanakları da araştırılmaktadır. Sık ve yanlış antibiyotik kullanımı sonucunda, insan ve hayvanlarda hastalık meydana getiren patojenlerin direnç kazanması, giderek artan bir sorun haline gelmiştir. Multi resistant patojen bakterilerin artışı, insan ve hayvan enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde alternatif antimikrobiyel ajanların kullanımı konusundaki çalışmaları başlatmıştır. Bu amaçla bir çok bilim adamı bakteriyosinlerin tıbbi ve kişisel bakım ürünlerinde kullanım olanakları konusunda çalışmalar yapmaktadır (Dicks ve ark, 2011).

LAB bakteriyosinlerinin gıdalardaki kullanım alanları çok yaygın olsa da, lantibiyotiklerin toksik olmaması ve Gram pozitif patojenlere karşı etkin olmaları nedeniyle bunların klinik etkinlikleri de araştırılmaktadır. Bazı lantibiyotikler etki mekanizmaları ve çoklu ilaç direnci gösteren dirençli patojenlere etkili olmaları nedeniyle muhtemel terapotik ajanlar olarak düşünülmektedirler. Geniş spektrumlu lantibiyotikler teorik olarak klinik Gram pozitif insan veya hayvan patojeni olan bakterilere karşı kullanılabilir. Örneğin, iki peptidli bir lantibiyotik olan laktisin 3147 *Staphylococcus aureus*'a (metisiline dirençli *S. aureus*'da dahil), enterokoklara (VRE dahil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*), *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes*'e karşı etkilidir. Hayvan modelleriyle yapılan, başlangıç in vivo denemelerde, lantibiyotiklerin, *S. pneumoniae* ve MRSA kaynaklı enfeksiyonları, önlemede

başarılı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bakteriyosinler, gıdaların korunmasında kullanımının yanı sıra mastitis enfeksiyonlarının önlenmesinde de büyük öneme sahiptir (Kruszewska ve ark, 2004; Sit ve Vederas, 2008).

Salivaricin A2 ve B üreten *Streptococcus salivarius* suşunu içeren besin katkısı BLIS K12 ise boğaz koruyucu olarak kullanılmakta ve Yeni Zelanda da ağız kokusundan sorumlu bakteriye karşı inhibitör olarak kullanılmaktadır (Tagg, 2004). Tüm bunların yanısıra nisin doğum kontrol etkinliği olduğu bulunmuştur (Reddy ve ark, 2004).

En etkili bakteriyosin bebek dışkılarından izole edilen *L.gasseri* L39 tarafından üretilen gasserisin A'dır. Bu bakteriyosin saflaştırılarak yapısal geni klonlanmış ve sekans analizi gerçekleştirilmiştir (gaaA). Gasserisin A, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyal etkiye sahip bir bakteriyosindir. Tüm primer yapısı göz önüne alınacak olursa gasserisin A sınıf 2 bakteriyosinlerdendir (N- ve C-terminal amino asitleri bağlanmıştır) (Kawai ve ark, 2001).

2.7. Bakteriyosinlere Direnç

Bakteriyosinlerin gıda koruma amacıyla kullanılabilmesi için, hedef türlerin direnç geliştirme potansiyelleri ve mekanizmaları göz önünde bulundurulmalıdır. Bakteriyosinlerin hedef aldığı bakterilerin, zaman içerisinde o bakteriyosine karşı direnç geliştirme olasılıkları, gıda güvenliğinde etkin olarak kullanımları konusunda, bazı endişelere yol açmaktadır. Bu alanda en fazla çalışılan bakteriyosinler nisin ve bazı Sınıf IIa peptidleridir. *L. monocytogenes*'de nisine karşı spontan mutasyon oluşma sıklığı (suşa bağlı olarak) 10⁻²-10⁻⁷ oranında değişmektedir (Gravasen ve ark, 2002). *Streptococcus pneumoniae*'nin stabil, nisine dirençli mutantları ise, lantibiyotiğe sürekli maruz kaldıkları takdirde dirençleri artmaktadır. Bu spontan mutantlarda direnç gelişimi hücre zarının yükü ve akışkanlığının değişimi, hücre duvarı kalınlığı, hücre duvarı yükü ve bu faktörlerin kombinasyonu ile ilgilidir (Vadyvaloo ve ark, 2004; Başbülbul, 2009; Türemiş, 2012). Bu tür değişimler, doğrudan düşük oranda lantibiyotiğe maruz kalındıktan sonra veya başka bir strese

karşı adaptif cevap olarak ortaya çıkar. Hücrelerin nisine karşı nasıl dirençli hale geldiği tam olarak anlaşılmamış olsa da, Lipid II kısmındaki varyasyonlarla ilgili olmadığı bilinmektedir. Nisin direncinin gelişime neden olan veya nisine kalıtsal tolerans sağlayan genetik lokuslar tanımlanmıştır. Kalıtsal toleransda en önemli faktör hücre duvarı yüküdür. Sınıf II bakteriyosinlere direncin en iyi çalışıldığı örneklerden biri Sınıf II-a dirençli *L. monocytogenes*'dir. Bakteriyosine direnç fosfotransferaz sistemin mannoz permeazının ekspresyonunu azaltmaktadır. Nisine dirençli mutantlarda olduğu gibi hücre zarının akışkanlığı ve hücre yüzeyinin yükü direnç gelişiminde önemlidir (Vadyvaloo ve ark ,2002, Vadyvaloo ve ark, 2004).

2.8. Enterosinler

Enterokokların ürettikleri bakteriyosinler enterosin olarak isimlendirilmektedir. Enterosinler, diğer çoğu bakteriyosin gibi, sitoplazmik membran üzerinde etkilidirler. Hücre membranında, gözenekler oluştururlar ve böylece elzem hücre içi moleküllerin sızıntısı ile sonuçlanan transmembran potansiyeli ve/veya pH gradiyentini bozarlar. Enterosinler ve bakteriyosin oluşturma özelliğindeki enterokoklar geleneksel kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilirler. Enterokokal bakteriyosinler, genellikle *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., ve *E. coli* gibi bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (Foulquie ve ark, 2006; İşleroğlu ve ark, 2008).

Bakteriyosin üreten enterokokların starter kültür, yardımcı kültür (adjunct kültür) veya koruyucu kültürler olarak kullanılması gıda fermantasyon proseslerinde enterosinlerin direkt eklenmesinin yanında fermantasyon teknolojileri arasında da büyük ilgi noktasıdır. Fermente gıdaların organoleptik özelliklerine katılması ve teknolojisinde kullanımı açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar enterokokların starter ve yardımcı kültür (adjunct) olarak kullanımının arttığını göstermektedir (Vuyst ve ark, 2003; Klein, 2003; Foulquie ve ark, 2006).

Enterosinler, proteinaz K, α -kimotripsin, tripsin ve pepsin gibi bazı proteolitik enzimlere karşı duyarlıyken lipaz, amilaz ve katalaz enzimlerine karşı dayanıklıdır. Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklıdır. Liyofilizasyonla kurutmadan sonra uzun süre stabilitelerini koruyabilmektedirler (Moreno ve ark, 2003; Nes ve ark, 2007).

Bakteriyosin üreten *Enterococcus*'lar doğaya yayılmış olup; süt ürünleri, fermente sucuklar, balık, sebze ve gastrointestinal yoldan izole edilmişlerdir (Sarantinopoulos ve ark, 2001). Bakteriyosinlerin gıda bozulması yapan organizmalar ile gıda kaynaklı patojenleri inhibe edici aktiviteleri nedeniyle gıda endüstrisinde biyokoruyucular olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır ve bu bileşiklerin geleneksel kimyasal koruyuculara bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Vuyst ve ark, 2003; Hugas ve ark, 2003; Park ve ark, 2003). Özellikle, enterosin AS-48, hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler üzerindeki geniş antimikrobiyel aktivitesinden dolayı, üzerinde en çok araştırma yapılan bakteriyosin arasında olmuştur.

Bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium*'un aynı zamanda iyi bir rekabetçi olması bu organizmanın teknolojik açıdan önemini arttırmaktadır (Hugas ve ark, 2003).

Enterococcus faecium'un ürettiği bakteriyosin gıda ürünlerinde raf ömrünün ve gıdanın güvenliğinin artırılmasında kullanılmaktadır. *Enterococcus faecium* bakteriosinlerinin starter kültür ya da biyokoruyucu olarak et ve süt endüstrisinde kullanımı yaygındır (Leroy ve ark, 2003; İşleroğlu ve ark, 2008).

2.9. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Enterosinlerin Önemi

Enterokoklar GRAS olarak kabul edilme ihtimali olan bakteri grupları arasında yer almaktadır. Bazı enterokok türlerinin starter kültür, yardımcı kültür veya probiyotik kültür olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Enterokoklar özellikle de geleneksel peynirlerin aroma gelişiminde önemli bir rol oynamaktadırlar.

Enterokoklar bakteriyosin gibi antimikrobiyal peptit üretimleri, esterolitik, lipolitik aktiviteleri ile yararlı bir takım özelliklere sahip olmaları yanında nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaları açısından risk de taşımaktadırlar (Vuyst ve ark, 2003).

Gerek klinik kaynaklardan ve gerekse gıda kaynaklarından sıkça izole edilen suçların *E. faecalis* ve *E. faecium* olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Vuyst ve ark, 2003; Özdemir ve ark, 2011; Türemiş, 2012). Daha önce de değindiğimiz gibi enterokoklar bakteriyosin üretimleri ve bazı patojen bakteriler üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olmaları nedeniyle yararlı mikroorganizmalar arasında görülmektedir. Ancak, burada ihmal edilmemesi gereken durum özellikle de klinik kaynaklarda sıkça karşımıza çıkan virülans genlerinin gıda kaynaklı olanlarda da taşınıyor olabileme ihtimalidir. Nitekim şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hem klinik hem de gıda kaynaklı enterokokların bazılarında bu virülans genlerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bakteriyosin üreten bütün enterokok türlerinin yararlı türler olduğunu bildirmek hatalı olmaktadır. Enterokoklardan elde edilen ve gıdalarda koruyucu ticari kültür, starter kültür veya probiyotik kültür olarak kullanılması düşünülen enterokokların, virülans özelliğe sahip olup olmadıklarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı gıdalarda kullanılacak enterokoklara güvenli diyebilmek için sadece bakteriyosin üretimlerini tespit etmek yeterli olmamaktadır, virülans taşıyıp taşımadıkları açısından genetik yapıları da ayrıntılı incelemelidir. Yapılan çalışmalarda hemolitik aktivite eksikliği olan ve sitolisin veya antibiyotik geni taşımayan bakteriyosin üreten *E. faecium* türlerinin starter kültür, yardımcı kültür veya probiyotik kültür olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. *E. faecalis* türleri beta hemoliz olayını kısıtlamamıştır, ancak *E. faecium* türleri arasında sitoliz geni bulunmamıştır, beta hemoliz hem gıda hem de klinik kaynaklı örneklerde meydana gelmiştir (Moreno ve ark, 2003; Vuyst ve ark, 2003; Sabia ve ark, 2007; Klibi ve ark, 2008; Özdemir ve ark, 2011; Nemade ve Musaddiq, 2012).

Bakteriyosinlerin genetik yapılarına bakıldığında sitolisin içerenlerin daha çok klinik *E. faecalis* tarafından üretildiği görülmektedir ve virülansla ilişkilendirilmektedir. Fagasioza direnç gibi hemolisin veya sitolisin üretim olayları enterokokların virülans özelliklerine katkı yapmaktadır. Özellikle de vankomisin

dirençli enterokoklar bu anlamda tehlike yaratmaktadır. Bakteriyosin üretimi, hemolisin ve vankomisin direnci arasındaki ilişki hem gıda hem de sağlıktaki önemleri açısından bakteriyosin üreten enterokokların güvenli ticari uygulamalarını değerlendirilmesinde kullanılan normlardır (Sabia ve ark, 2007; Klibi ve ark, 2008; Türemiş, 2012).

2.10. Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkileriyle İlgili Yapılan Çalışmalar

Cintas ve ark (1998), enterosin L50, pediosin PA-1, nisin A ve laktosin S'nin, bazı bozulma etmeni ve gıda kaynaklı patojenlere karşı aktivitelerini incelemişlerdir. Enterosin L50 ve pediosin PA-1 *L. monocytogenes*'e karşı fazlaca aktif olmalarına rağmen, nisin A ve laktosin S, aynı bakteriye karşı inhibitör aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, enterosin L50, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'a karşı da antimikrobiyel aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu patojenler, diğer bakteriyosinlere karşı ise, az dirençli ya da kuvvetli dirençli bulunmuştur. *B. cereus* ATCC9139'un ise, saf enterosin L50 ve nisin A ekstraktlarına, duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Morgan ve ark (2000), Laktisin 3147 üretici suşlarının, Cottage peynirinin ve doğal yoğurtların korunmasında *L. monocytogenes* ve *B. cereus* suşlarına karşı kullanıldığını belirtmişlerdir.

Vignolo ve ark (2000), yaptıkları çalışmalarında laktosin 705 ve enterocin CRL35 bakteriyosinleri değişik *Listeria* türleriyle bulaştırılmış kıyma ve et sularında ayrı ayrı ve kombine olarak denenmişlerdir. Denemelerin neticesinde *Listeria* türlerinin 24 saatlik depolama sürecinde büyük oranda inhibe olduğu ve özellikle iki bakteriyosinin birlikte kullanıldığında etkinin daha güçlü olduğu belirlemişlerdir.

Ivanova ve ark (2000), Bulgaristan'da üretilen bozadan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* B14'ün ürettiği bakteriyosin laktis B14'ün bazı *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc dextranicum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* tür ve suşları üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu, ancak *P. fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*,

Citrobacter freundii, *Klebsiela pneumoniae*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. butyricum*'a karşı inhibitör etkiye sahip olmadığını belirlemişlerdir.

Lee ve Paik (2001), *L. lactis* NK24 tarafından üretilen laktisin NK24'ün çoğu LAB'lerine karşı geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu Gram negatif bakterilerden *E.coli* KCMM32396 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442'nin gelişimlerini inhibe ettiği ve bunun yanında mayalara karşı hiçbir inhibitör etkiye sahip olmadığını saptamışlardır.

Benkerroum ve ark (2002), *L. lactis* spp. *lactis* CCM, tarafından üretilen bakteriyosinin, test edilen *L. monocytogenes* suşuna karşı, inhibitör aktiviteye sahip olduğu; ancak, *Micrococcus flavus*, *L. lactis* spp. *lactis* biov. *diacetylactis* ve *Bacillus* türlerine karşı inhibitör etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Özdemir ve ark (2002), tarafından yapılan çalışmada Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasil türlerinin *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı agar spot test ve agar kuyu difüzyon testine göre antibakteriyel etkilerini saptamışlardır. Fermente sucuk üretiminde *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un gelişiminin kontrol altına alınması için bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri metabolit oluşturan laktobasillerin, gerekli testleri yapıldıktan sonra starter kültür olarak kullanılmasını önermişlerdir.

Osmanağaoğlu (2003), bozulmuş vakumlu paketlenmiş Türk sucuklarından izole edilmiş *Leuconostoc carnosum* türlerinin ürettiği bakteriyosin *Listeria monocytogenes* ve LAB'leriyle yakın ilişkili türlere karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmiştir.

Rodriguez ve ark (2003), *L. lactis* spp. *lactis* IPLA 729 tarafından üretilen nisin Z' nin dar bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve sadece Gram pozitif bakterilerden birkaç tür ve suşu üzerinde inhibitör etki gösterdiğini saptamışlardır.

Savadogo ve ark (2004), Faso fermente sütünden izole edilen ve bakteriyosin üreten 8 LAB izolatının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. İzole edilen bakteriyosinin *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Tahiri ve ark (2004), dondurulmuş midyelerden izole ettikleri *Carnobacterium divergens* M35 izolatının ürettiği divergicin M35 bakteriyosinin güçlü bir antilisteriyal etki gösterdiğini ve özellikle *L. monocytogenes*'e karşı yüksek antimikrobiyel etki gösterdiğini fakat *E. coli*'ye karşı etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Todorov ve Dicks (2005a), *L. plantarum* ST23LD ve ST341LD, *E. faecium* ST311LD ve *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD tarafından üretilen bakteriyosinlerin bazı Gram pozitif bakterilere (*E. faecalis*, *L. casei* ve *S. pneumoniae*) ve Gram negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı inhibitör etki gösterdiğini saptamışlardır.

Todorov ve Dicks (2006), bozadan izole ettikleri 40 izolatın antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. İzolatların, *L. casei*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkili olduklarının fakat Gram negatif bakterilere karşı sadece *S. thermophilus*'un ürettiği thermophilin 81, *L. lactis* KCA2386'in ürettiği bakteriyosinin, *L. plantarum*'un ürettiği plantaricin 35d ve *Lc. lactis* NK24'ün ürettiği lacticin NK24 bakteriyosininin etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Von Mollendorff ve ark (2006), bozadan izole edilen *L. plantarum* ve *L. fermentum* tarafından üretilen bakteriyosinlerin, Gram pozitif bakteriler üzerinde geniş bir inhibitör spektruma sahip olduğu belirlemişlerdir.

Todorov ve ark (2007), *L. plantarum* AMA-K tarafından üretilen bakteriyosinin, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus* ile *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ya karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Solomakos ve ark (2008), nisin ile kekik yağının kombine kullanımı sonucunda, kıymada *L. monocytogenes* sayısında azalma olduğu bildirilmiştir. Uygulanan dozlar arasında en etkili olan, %0,6 kekik yağı ve 1000 IU/g nisin olarak belirlenmiştir ve bakteri sayısı, bu kombine kullanım sayesinde Avrupa Birliği'nin *L. monocytogenes* için olan 2 log cfu/g resmi limitinin altına düştüğünü saptamışlardır.

Sit ve Vederas (2008), iki peptitli laktisin 3147; *S. aureus* (metisilin dirençli *S. aureus*"da dahil), enterokoklar (VRE dahil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*,

Streptococcus mutans), *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes* gibi bakteri türlerine karşı in vitro etkinliğe sahip olduğunu saptamışlar. Bu nedenle bakteriyosinler, gıdaların korunmasında kullanımının yanı sıra mastitis enfeksiyonlarının önlenmesinde de büyük öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Anas ve ark (2008), patojen mikroorganizmalara karşı LAB tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin tespiti amacıyla mikrobiyolojik ve biyokimyasal yöntemleri kullanmışlardır. Çalışmada Batı Cezayir’de çiğ keçi sütünden izole edilen LAB’nden 8 izolat belirlenmiştir. Bu türlerden bir tanesinin (*L. plantarum*) *S. aureus*’un gelişimini azalttığını belirlemişlerdir.

Nawaz ve ark (2009), günümüzde metisilin dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda antibiyotik seçimi zorlu hale geldiği için farklı stratejiler geliştirilmesi gerektiğinin altını çizerek, metisilin dirençli bakterilere karşı bakteriyosin üreten bakterilerin etkisini araştırmışlardır. Çeşitli doğal ortamlardan elde edilmiş olan ve bakteriyosin üreticisi olduğu düşünülen izolatların biyokimyasal özelliklerine bakılarak *Lactobacillus fermentum* olduğu anlaşılmış sonuç olarak da 50 izolattan sadece 1 tanesi MRSA’ya karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu çalışma ile *L. fermentum*’un MRSA’ya karşı etkili bakteriyosin üretimi için kullanılabileceğini saptamışlardır.

Ben Belgacem ve ark (2010), yaptıkları bir çalışmada, “Gueddid” olarak adlandırılan, geleneksel Tunus fermente et ürününden, 24 adet enterokok suşu izole etmişler ve bu suşların antimikrobiyel aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Moleküler yöntemle, bunların tümünün, *E. faecium* olarak tanımlamışlardır. Aynı araştırmada, enterokok suşlarını, gıda güvenliği ve fonksiyonel özellikleri açısından incelemişler ve tüm izolatların, *Listeria* spp. dahil olmak üzere, gıdalarda bozulma yapan bir çok bakteriye ve gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör etkisi gösteren bakteriyosinleri ürettiklerini belirlemişlerdir.

Mohankumar ve Murugalantha (2011), manda, keçi ve inek gibi hayvanların çiğ sütünden bakteriyosin üreten *Lactobacillus* türlerini izole ederek antimikrobiyal aktiviteyi belirlemeyi ve bakteriyosin karakterizasyonunu amaçlayan bir çalışma yapmıştır. 50’si inek sütünden, 22’si manda sütünden ve 28’i keçi sütünden 100 bakteri izole edilmiş ve fenotipik özelliklerine göre

Lactobacilli olarak tanımlanmıştır. Daha sonrasında bakteriyosin üretimi görülen 10 tür indikatör organizmalara karşı ve patojen organizmalara karşı agar kuyu difüzyon testi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus vulgaris*'in Lactobacilli izolatları tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Xie ve ark (2011), yaptıkları bir çalışmada geleneksel fermente süt ürünü olan Koumiss'den izole ettikleri *L. plantarum* LB-B1 türünün bakteriyosin üreterek *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Sieladie ve ark (2011), Kamerun'daki çiğ inek sütünden izole edilmiş laktobasil suşların probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmalarında antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için agar spot test ile yaptıkları taramalarda tüm izolatların patojen indikatör suşların (*L. innocua* ATCC 33090, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus*, *S. mutans* DSM 20523, *E. faecalis* ATCC10541, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli*) gelişimini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Türemiş (2012), yaptığı çalışmada, 10 adet gıda kaynaklı ve 10 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarının bakteriyosin üretebilme özelliklerini, *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşturdukları inhibitör etkileri ile belirlemiş olup, üretilen bakteriyosinlerin *Listeria monocytogenes*'i belirli düzeylerde inhibe ettiğini saptamıştır.

Demir (2014), yaptığı çalışmada fermente süt ürünlerinden izole ettikleri *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cislerine ait olan 138 tür bakteriyosin üretiminin karakterizasyonunu incelemiş ve LAB'nin antibakteriyal etki spektrumlarının belirlenmesi için agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi olmak üzere iki ayrı yöntem belirlemiştir. Agar spot test sonucunda 138 LAB de (% 100) zon oluşturmuş yani indikatör mikroorganizma olarak kullanılan *E. coli*'ye, *B. cereus*'a, *L. monocytogenes*, *M. luteus*'e karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini saptamıştır. Agar kuyu difüzyon testinde ise, her iki metotta da pozitif kontrol olarak kullanılan *L. lactis* DSMZ 20729 dışında hiçbir LAB'nin zon oluşturmadığını belirtmiştir.

2.11. Gıdalarda Enterosin Kullanımıyla İlgili Yapılan Çalışmalar

Laukova ve ark (1999), Süt ürünlerinde yapılan bir çalışmada enterokokal bir bakteriyosin olan enterosin CCM 4231'in *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Toit ve ark (2000), *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin genellikle enterokok türlerine karşı etkili olduğu, *E. faecium* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin ise, *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *Cl. tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğunu saptamışlardır.

Garcia ve ark (2004), *E. faecalis* EJ97 tarafından üretilen enterosin EJ97'nin *Bacillus macroides*, *B. coagulans* ve *Bacillus maroccanus*'un gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Grande ve ark (2005), tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* A-48-32'den üretilen enterosin AS-48'in, meyve sularında bozulma etmeni olan *Alicyclobacillus acidoterrestris*'e karşı etkisi incelenmiş ve bu bakterinin, enterosin AS-48 (25µg/mL) tarafından inaktif edildiği ve 14 gün boyunca gelişmediğini belirlemişlerdir.

De Kwaadsteniet ve ark (2005), *E. mundtii* ST15 tarafından üretilen bakteriyosinin, hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu bakteriyosinin, test edilen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* ve *Clostridium*'un bazı suşları ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *S. caprinus*'un gelişimlerini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Ananou ve ark (2005b), *E. faecalis* A-48-32 tarafından üretilen enterosin AS-48'in sosislerde *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini saptamışlardır.

İşleroğlu (2006), Tokat yöresinde geleneksel olarak üretilen beyaz peynirden izole edilen *Enterococcus faecalis* KP tarafından sentezlenen enterosin KP'nin test edilen bazı gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere, örneğin *Listeria monocytogenes*, *L. ivonovii*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. dissolvens*, *Leuconostoc*

cremoris, *Lactobacillus plantarum*, *Leu. mesenteroides*'e karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Sparo ve ark (2006), mısır silajından izole ettikleri *Enterococcus faecalis* MR99 izolatının diğer enterokoklar, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* test organizmalarına karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Gharairi ve ark (2008), Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium* MMT21 suşunun ürettiği enterosin A ve B'nin, laktik asit bakterilerinin yanı sıra, *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Yoon ve ark (2008), fermente bir soya ürünü olan "Chungkukjang"dan izole edilen, *E. faecium* S2C10 ve S2C11'nin ürettiği bakteriyosinlerin, *L. monocytogenes* ve bazı LAB'lerine karşı antimikrobiyel etki gösterdiklerini saptamışlardır.

Basanta ve ark (2008), *E. faecium* L50 tarafından üretilen enterosin L50, enterosin P ve enterosin Q'nun biralarda bozulmaya neden olan *Lb. brevis* ve *P. damnosus* ile *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Cl. botulinum*'a karşı oldukça etkili olduğu saptamışlardır.

Sarika ve ark (2011), *E. faecalis* CD1'in ürettiği bakteriyosinin Gram pozitif olan *B. subtilis*, *Bacillus pumilus* ve *Listeria* sp. ayrıca Gram negatif *P. aeruginosa* ve *E. Coli*'nin büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Cebrian ve ark (2012), İspanya'da yaptıkları bir çalışmada, İspanyol koyun peyniriden izole edilen *E. faecalis* UGRA1'in AS-48 enterosin ürettiğini tespit etmişlerdir. *E. faecalis* UGRA1 suşunda, gıda güvenliği açısından biyojenamin üretimi, virülans genler ve antibiyotik direnç durumu araştırılmıştır. Ayrıca, bu suşun, *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, geniş spektrumlu bakteriyosin üreten bu suşun gıda muhafazasında koruyucu bir ajan olarak ve bir probiyotik olarak biyoteknolojik potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir. Abanoz (2014), *E. faecalis* KT11'in kültür süpernatanın, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus* antibiyotik dirençli bakteriler de dahil olmak üzere bir çok Gram pozitif ve bazı Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri Kùltürleri

Bu çalışmada, daha önceden izole edilmiş olan hem klinik hem de gıda kökenli enterokoklardan 20 adet suş kullanılmıştır. Gıda kaynaklı enterokok suşları, çeşitli gıdalardan, klinik kökenli enterokok suşları ise, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen intestinal kolonizasyon etkeni ve klinik enfeksiyon etkeni olan klinik örneklerden izole edilmiştir. Suşlarla ilgili bilgiler, Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gıda ve klinik kaynaklı enterokok izolatları

Örnek Adı	Suş
Urfa Peyniri	<i>E. faecalis</i> -A1
Antep Peyniri	<i>E. faecium</i> -E5
Erzincan Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i> -H8
Hatay İnek Peyniri	<i>E. faecium</i> -L13
Kaşar Peyniri	<i>E. faecium</i> -P18
Ev Yapımı Sucuk	<i>E. faecalis</i> -AS1
Tavuk Eti	<i>E. faecalis</i> -JS1
Tavuk Eti	<i>E. faecalis</i> -LS1
Ev Yapımı Sucuk	<i>E. faecalis</i> -NS1
Kangal Sucuk	<i>E. faecium</i> -YS1
Klinik Kaynak	<i>E. faecium</i> -V150, V105, V98, V146, V198
Klinik Kaynak	<i>E. faecalis</i> -227, 225, 228, 226, V188

Ayrıca antimikrobiyel etkinin belirlenmesinde *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*- ATCC 25923, *Bacillus cereus* – Ankara Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve *Salmonella* Enteritidis – Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, patojen bakteriler kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan besiyerleri, inkübasyon koşulları ve kullanım amaçları, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, inkübasyon koşulları ve kullanım amaçları

Besiyeri	İnkübasyon Koşulları	Kullanım amacı
Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA) Merck, hazır besiyeri	37°C’de, 24 saat, aerob	Enterokok ön kültürü
Brain Heart Broth (BHI) Merck, hazır besiyeri	37°C’de, 24 saat, aerob	Enterokok stok kültürü
MRS (Man Ragosa and Sharp) Broth Merck, hazır besiyeri	37°C’de, 24 saat, aerob	Enterokok suşlarının geliştirilmesi ve bakteriyosin ekstraksiyonu
Nutrient Agar Merck, hazır besiyeri	37°C’de, 24 saat, aerob	Patojen mikroorganizmaların geliştirilmesi
Nutrient Broth Merck, hazır besiyeri	37°C’de , 24 saat, aerob	Patojen mikroorganizmaların geliştirilmesi
Mueller-Hinton Agar Merck, hazır besiyeri	37°C’de, 24 saat, aerob	Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi

Ayrıca çalışmada; pH ayarlanmasında HCl (Hidrojen klorür) ve NaOH (Sodyum hidroksit), bakteriyosin ekstraktını süspanse etmek için potasyum fosfat ve proteinlerin çöktürülmesi aşamasında ise amonyum sülfat çözeltisi kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Enterokok Stok Kùltürlerinin Saklanması

Daha önceden izole edilmiş olan hem klinik hem de gıda kökenli enterokok suşları, %10 gliserol ve %10 kan içeren Brain Heart Broth içerisinde, -20°C’de stok kùltür olarak saklanmıştır.

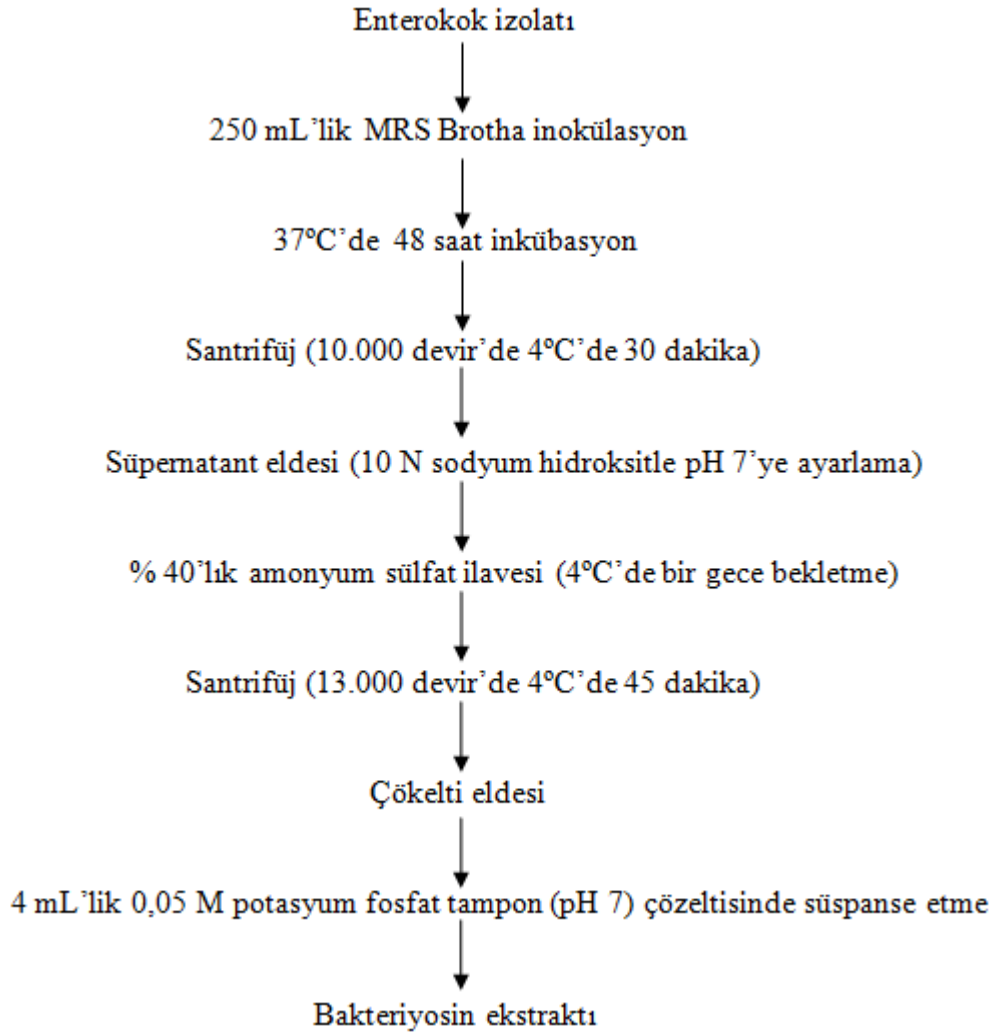
3.2.2. Enterokok Ön Kùltürlerinin Hazırlanması

Stok kùltürden, öze yardımı ile alınan enterokok izolatlarının her birinden, Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA)’a sürme ekim yapılarak, plaklar 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden, bakteriyosinin kısmi saflaştırılması için bir öze dolusu alınarak, bakteriyosin eldesi için, MRS broth besiyerine inoküle edilmiştir (Savadogo ve ark, 2004).

3.2.3. Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması

Enterokok izolatlarından bakteriyosinin kısmi saflaştırılması Şekil 3.1’ de özetlenmiştir. Buna göre saf enterokok izolatlarının her birinden bir öze dolusu alınıp, 5 mL’lik MRS broth besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde gelişen kùltürler, 250 mL’lik MRS broth besiyerlerine dökölüp, 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, gelişen kùltürler 10.000 devirde +4°C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek, yeni tüplere süpernatant (kùltür üst sıvısı) aktarılmış ve süpernatantta, organik asitin antimikrobiyel etkisini engellemek için 10 N sodyum hidroksitle (NaOH) süpernatantın pH’ı 7,0’ye ayarlanmıştır. Daha sonra süpernatant içerisinde proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, son konsantrasyon oranı %40 olacak şekilde, yavaş yavaş amonyum sülfat ilave edilmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen süpernatantlar, santrifüj tüplerine aktarılmış ve +4°C’de bir gece

bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, 13.000 devirde +4°C’de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda, üst faz dökülmüş ve kalan çökelti 4 mL steril 0,05 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde çözümüştür. Süspanse edilen çökelti karışımı, kısmi bakteriyosin ekstraktı olarak kullanılmıştır.



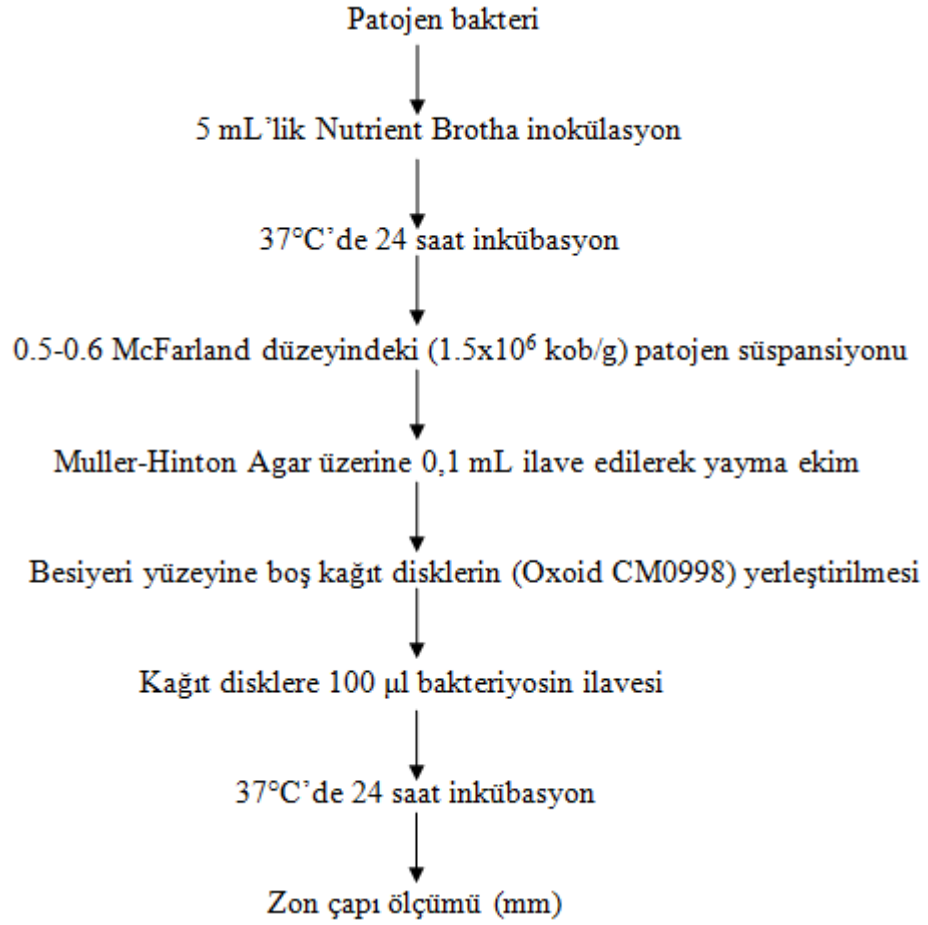
Şekil 3.1. Enterokok izolatlarından bakteriyosinin kısmi saflaştırılması (Savadogo ve ark, 2004).

Bakteriyosin ekstraktının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Salmonella* Enteritidis’e karşı antimikrobiyel etkisini belirlemek için Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu kullanılmıştır. Deneme, iki paralelli olarak çalışılmıştır (Moreno ve ark, 2003; Savadogo ve ark, 2004; Türemiş, 2012).

3.2.4. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılacak patojen mikroorganizmaların her biri stok kültürlerinden bir öze dolusu alınarak Nutrient Agara ekim yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.2’de disk difüzyon metodu ile antimikrobiyel etkinin belirlenme aşamaları özetlenmiştir. Buna göre gıda ve klinik kökenli enterokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinin antibakteriyel aktivitesini belirlemek için, inkübasyon sonrası gelişen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Salmonella Enteritidis* patojen izolatlarının her birinden bir öze dolusu alınıp, 5 mL’lik Nutrient Broth besiyerlerine inoküle edildikten sonra, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen koloniler, McFarland Standardına göre 0,5-0,6 McFarland düzeyinde ($1,5 \times 10^6$ kob/g) steril fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmiştir. Elde edilen süspanسیون, Mueller-Hinton Agar içeren petrilere, 0,1 mL ilave edilerek, drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Test mikroorganizması ekilmiş besiyeri yüzeyine, boş kağıt diskler (Oxoid CM0998) yerleştirilerek, üzerine 100 µL bakteriyosin örneği damlatılmıştır. Daha sonra petrilere, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneme iki paralelli olarak çalışılmış olup inkübasyon sonrası, patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir. Zon çapları mm cinsinden ölçülmüş ve ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir (Yamato ve ark, 2003; Campos ve ark, 2006).

Ek 1’de denememizin metot kısmında uygulanan işlemlere (saflaştırma aşamaları ve disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon görüntüsü) dair bazı fotoğraflar verilmiştir.



Şekil 3.2. Disk difüzyon metodu ile antimikrobiyel etkinin belirlenmesi (Yamato ve ark, 2003; Campos ve ark, 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

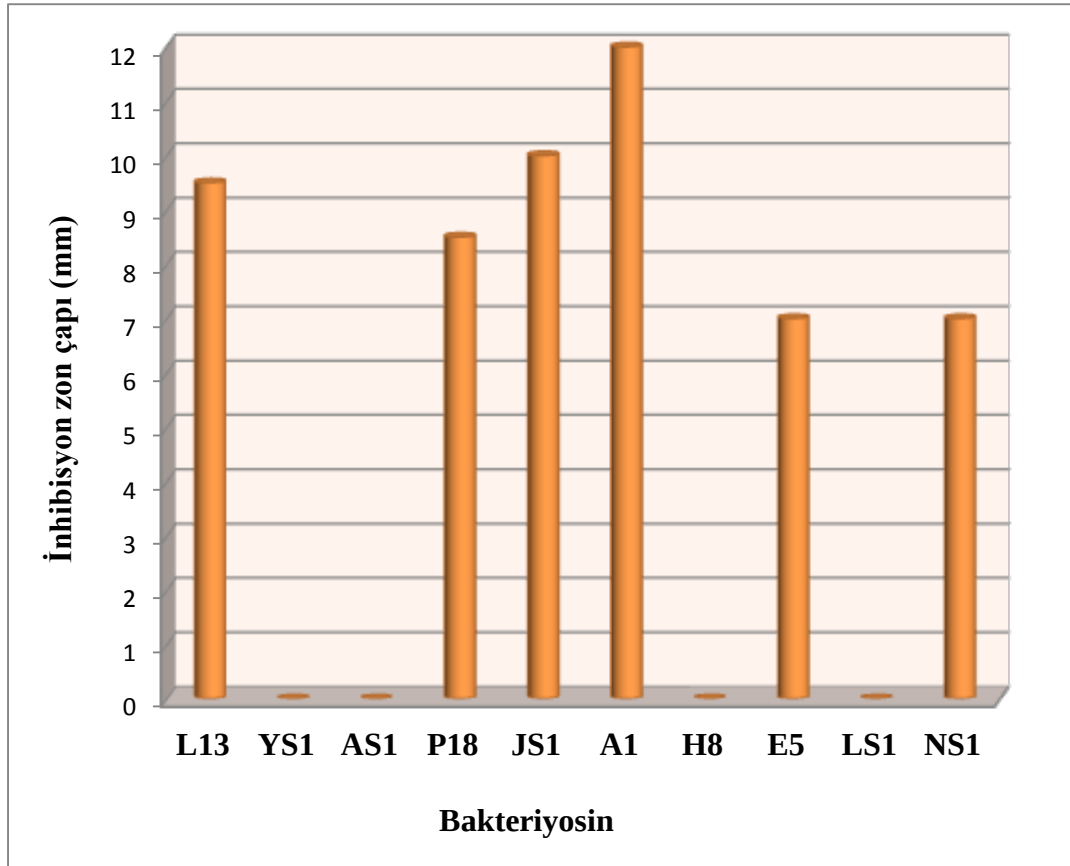
Bu çalışmada, hem gıda kaynaklı, hem de klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen bakteriler üzerine antimikrobiyel etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, suşun elde edildiği kaynağa göre karşılaştırılmıştır.

4.1. Kısmi Olarak Saflaştırılmış Bakteriyosinlerin Antimikrobiyel Etkisi

Çalışmamızda gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerin büyük bir kısmı, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan Gram negatif olan *S. Enteritidis*, *E.coli* ile Gram pozitif olan *B.cereus*, *S.aureus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermiştir.

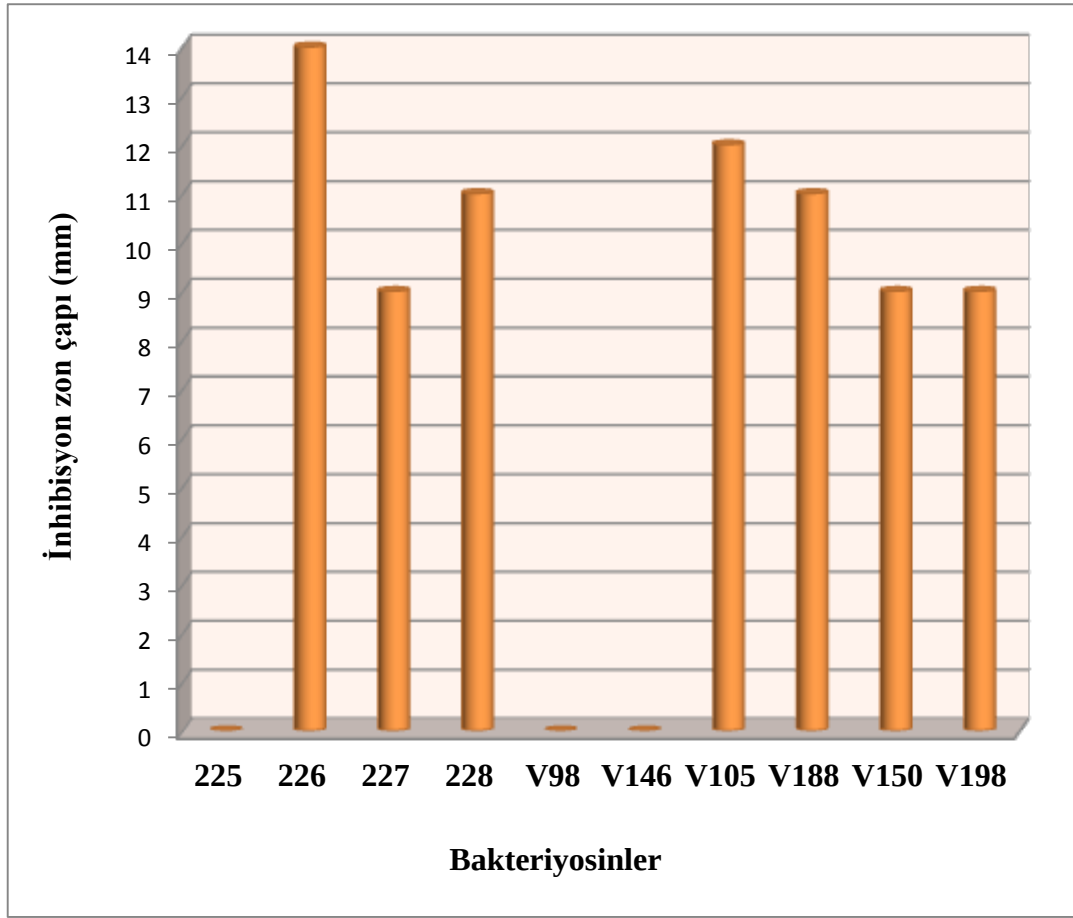
4.1.1. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin *S. Enteritidis*'e Karşı Antimikrobiyel Etkileri

Şekil 4.1'de gıda kaynaklı ve Şekil 4.2'de klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, çalışmamızda kullanılan *S. Enteritidis* üzerine oluşturdukları inhibisyon zon çapları verilmiştir.



Şekil 4.1. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *S. Enteritidis*' e karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.1'deki sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı bakteriyosinlerden L13 (*E. faecium*), P18 (*E. faecium*), JS1 (*E. faecalis*), A1 (*E. faecalis*), E5 (*E. faecium*), ve NS1 (*E. faecalis*) suşlarının *S. Enteritidis*'e karşı gösterdiği inhibisyon zon çaplarının 7-12 mm arasında değiştiği belirlenmiş olup, YS1 (*E. faecium*), AS1 (*E. faecalis*), H8 (*E. faecium*), LS1 (*E. faecalis*) suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyel etki göstermediği görülmüştür. Genel olarak değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 6 tanesi (L13, P18, JS1, A1, E5, NS1) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 6 adet gıda kaynaklı enterokok suşlarından 3 tanesinin *E. faecium* (L13, P18, E5) olduğu 3 tanesinin de *E. faecalis* (JS1, A1, NS1) olduğu belirlenmiştir. Suşlardan en fazla etkiyi A1 (*E. faecalis*) suşu (12 mm) göstermiş olup en az etkiyi gösteren ise NS1 (*E. faecalis*) ve E5 (*E. faecium*) suşları (7 mm) olmuştur.



Şekil 4.2. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *S. Enteritidis*'e karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.2'deki sonuçlar değerlendirildiğinde klinik kaynaklı bakteriyosinlerden 226 (*E. faecalis*), 227 (*E. faecalis*), 228 (*E. faecalis*), V105 (*E. faecium*), V188 (*E. faecalis*), V150 (*E. faecium*) ve V198 (*E. faecium*) suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *S. Enteritidis*'e karşı gösterdiği inhibisyon çaplarının 9-14 mm arasında olduğu belirlenmiş olup 225 (*E. faecalis*), V98 (*E. faecium*), V146 (*E. faecium*), suşlarından elde edilen bakteriyosinler, *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir. Genel olarak değerlendirdiğimizde klinik kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 7 tanesi (226, 227, 228, V105, V188, V150, V198) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 7 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarından 3 tanesinin *E. faecium* (V105, V150, V198) olduğu 4 tanesinin de *E. faecalis* (226, 227, 228, V188) olduğu belirlenmiştir. Suşlardan en fazla etkiyi 226 (*E. faecalis*) suşu (14 mm) göstermiş olup en az etkiyi

gösteren ise 227 (*E. faecalis*), V150 (*E. faecium*) ve V198 (*E. faecium*) suşları (9 mm) olmuştur.

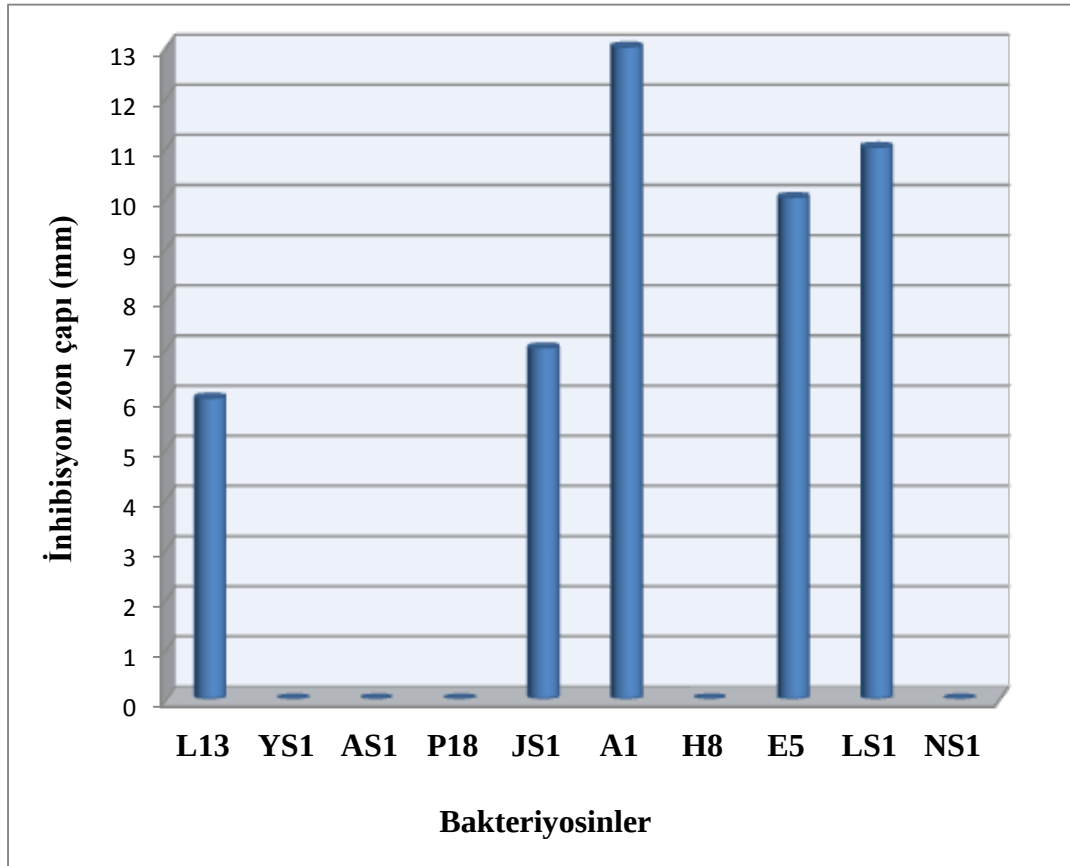
Genel olarak gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinleri değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı enterokok suşlarından 6 tane suş (L13, P18, JS1, A1, E5, NS1) *S. Enteritidis*'e antimikrobiyel etki gösterirken klinik kaynaklı enterokok suşlarından 7 adet suş (226, 227, 228, V105, V188, V150, V198) *S. Enteritidis*'e antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan hem gıda hem de klinik kaynaklı enterokok suşları Gram negatif bakteri olan *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

Theppangna ve ark (2007), farklı orijinlerden (et, köpek dışkısı, su kuşları dışkısı ve insan dışkısından) elde edilen 48 adet *E. faecium* ve 91 adet *E. faecalis*'den meydana gelen toplam 129 izolatın antibakteriyel aktivitesi *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve bizim çalışmamızda olduğu gibi *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* üzerinde test edilmiş ve izolatların %37'sinin en az bir test bakterisine karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyel etki göstermiş olması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Karagöl (2010), disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında, tulum peynirlerinden izole edilen Bakteriyosin-benzeri madde üreten LAB izolatlarının *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif test bakterilerine inhibitor etkileri olduğu kadar, *Esheriachia coli* ve *Salmonella* sp. gibi Gram negatiflere de inhibitör etki gösterdiğini belirtmiştir.

4.1.2. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin *B. cereus*'a Karşı Antimikrobiyel Etkileri

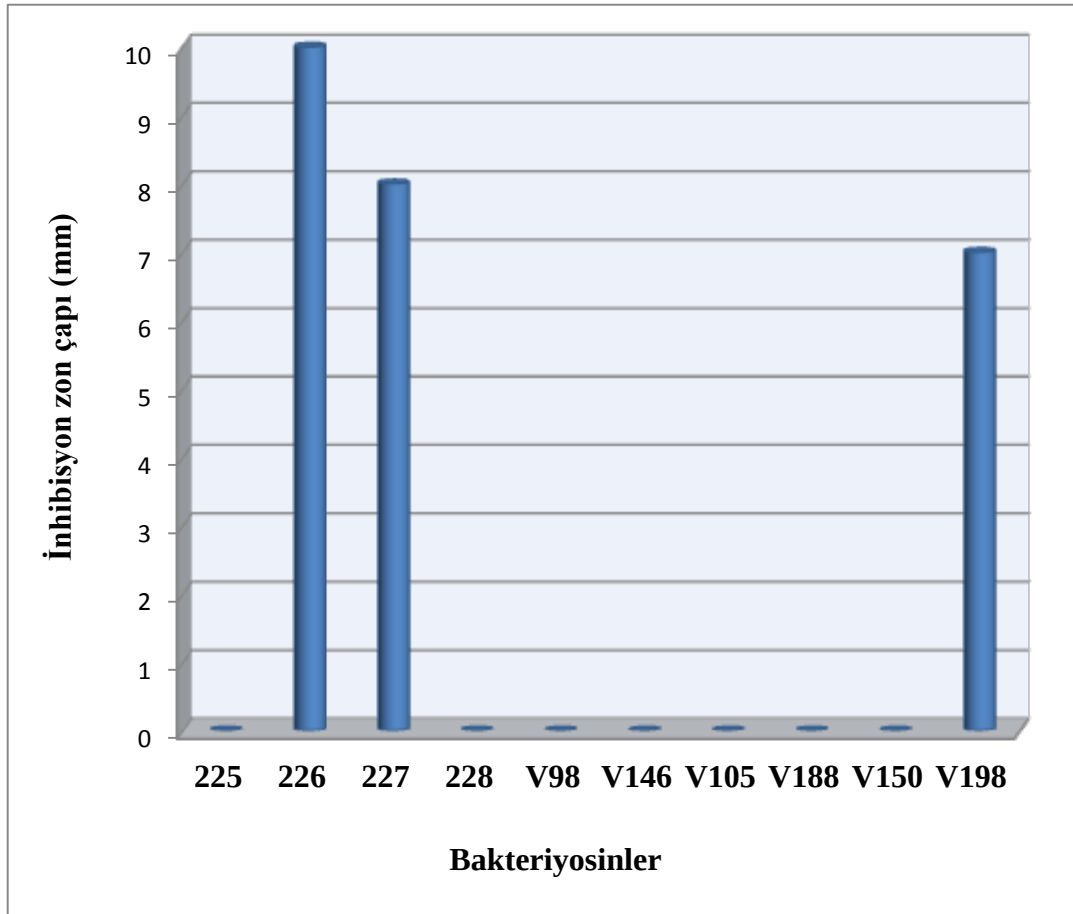
Şekil 4.3'de gıda kaynaklı ve Şekil 4.4'de klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, çalışmamızda kullanılan *B. cereus* üzerine oluşturdıkları inhibisyon zon çapları verilmiştir.



Şekil 4.3. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *B. cereus*'a karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.3'deki sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı bakteriyosinlerden L13 (*E. faecium*), JS1 (*E. faecalis*)' in *B. cereus*'a karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon çaplarının 6-7 mm arasında, A1 (*E. faecalis*) , E5 (*E. faecium*) ve LS1 (*E. faecalis*)'in inhibisyon zon çaplarının 10-13 mm arasında değiştiği belirlenmiş olup YS1 (*E. faecium*), AS1 (*E. faecalis*), P18 (*E. faecium*), H8 (*E. faecium*), NS1 (*E. faecalis*) suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *B.cereus*'a karşı antimikrobiyel

etki göstermediği görülmüştür. Genel olarak değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 5 tanesi (L13, JS1, A1, E5, LS1) *B. cereus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 5 adet gıda kaynaklı enterokok suşlarından 2 tanesinin *E. faecium* (L13, E5) olduğu 3 tanesinin de *E. faecalis* (JS1, A1, LS1) olduğu belirlenmiştir. Suşlardan en fazla etkiyi A1 (*E. faecalis*) suşu (13 mm) göstermiş olup en az etkiyi gösteren ise L13 (*E. faecium*) suşu (6 mm) olmuştur.



Şekil 4.4. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *B.cereus*'a karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.4'deki sonuçlar değerlendirildiğinde klinik kaynaklı bakteriyosinlerden 226 (*E. faecalis*) suşunun *B. cereus*'a karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon çapının 10 mm olduğu, 227 (*E. faecalis*) suşunun inhibisyon zon çapının 8 mm olduğu ve V198 (*E. faecium*) suşunun inhibisyon zon çapının 7 mm

olduğu belirlenmiş olup 225 (*E. faecalis*), 228 (*E. faecalis*), V98 (*E. faecium*), V146 (*E. faecium*), V105 (*E. faecium*), V188 (*E. faecalis*), V150 (*E. faecium*) suşlarından elde edilen bakteriyosinler, *B. cereus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir. Genel olarak değerlendirdiğimizde klinik kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 3 tanesi (226, 227, V198) *B. cereus*' a karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 3 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarından 1 tanesinin *E. faecium* (V198) olduğu 2 tanesinin de *E. faecalis* (226, 227) olduğu belirlenmiştir. Suşlardan en fazla etkiyi 226 (*E. faecalis*) suşu (10 mm) göstermiş olup en az etkiyi gösteren ise V198 (*E. faecium*) suşu (7 mm) olmuştur.

Genel olarak gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinleri değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı enterokok suşlarından 5 tane suş (L13, JS1, A1, E5, LS1) *B. cereus*'a karşı antimikrobiyel etki gösterirken klinik kaynaklı enterokok suşlarından 3 adet suş (226, 227, V198) *B. cereus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan hem gıda hem de klinik kaynaklı enterokok suşları Gram pozitif bakteri olan *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

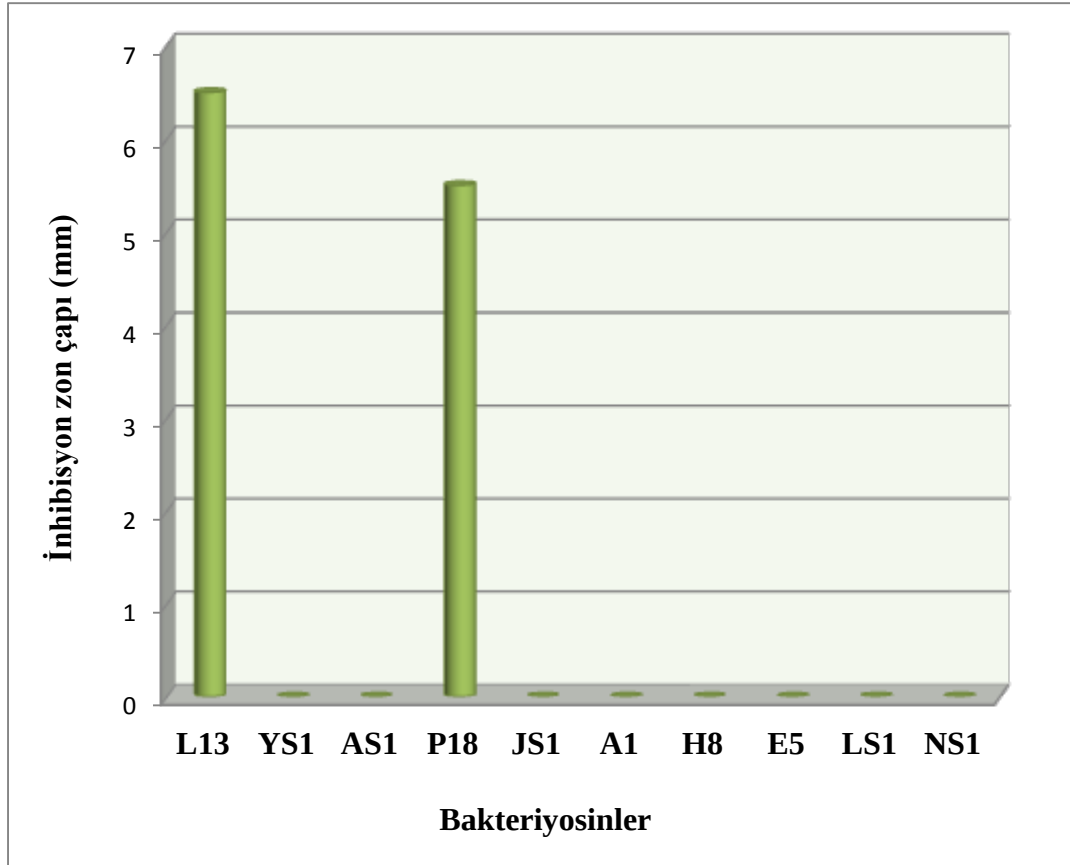
Achemchem ve ark (2005) yaptıkları bir araştırmada *E. faecium* F58'in ürettiği bakteriyosinin *Listeria*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'un bazı suşlarına karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Hajikhani ve ark (2007), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan beyaz peynirlerden izole edilen *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* diğer laktik asit bakterileri ve kendi enterokok suşlarına karşı antimikrobiyel aktivitelerini araştırmışlardır. Değerlendirilen tüm enterokok izolatlarının laktik asit bakterileri ve kendi izolatlarının dışında test edilen Gram pozitif ve Gram negatif gıda kaynaklı patojenler ve bozulma yapıcı bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterdiklerini saptamışlardır. Yine bir başka çalışmada Bilgin (2008), yaptığı araştırmada Tokat yöresinde geleneksel olarak üretilen beyaz peynirden izole edilen *E. faecium* HZ'nin , patojen bakterilerden *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı inhibitör aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda gıda kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, *B.*

cereus'a karşı antimikrobiyel etki göstermiş olması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

4.1.3. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin *E. coli*'ye Karşı Antimikrobiyel Etkileri

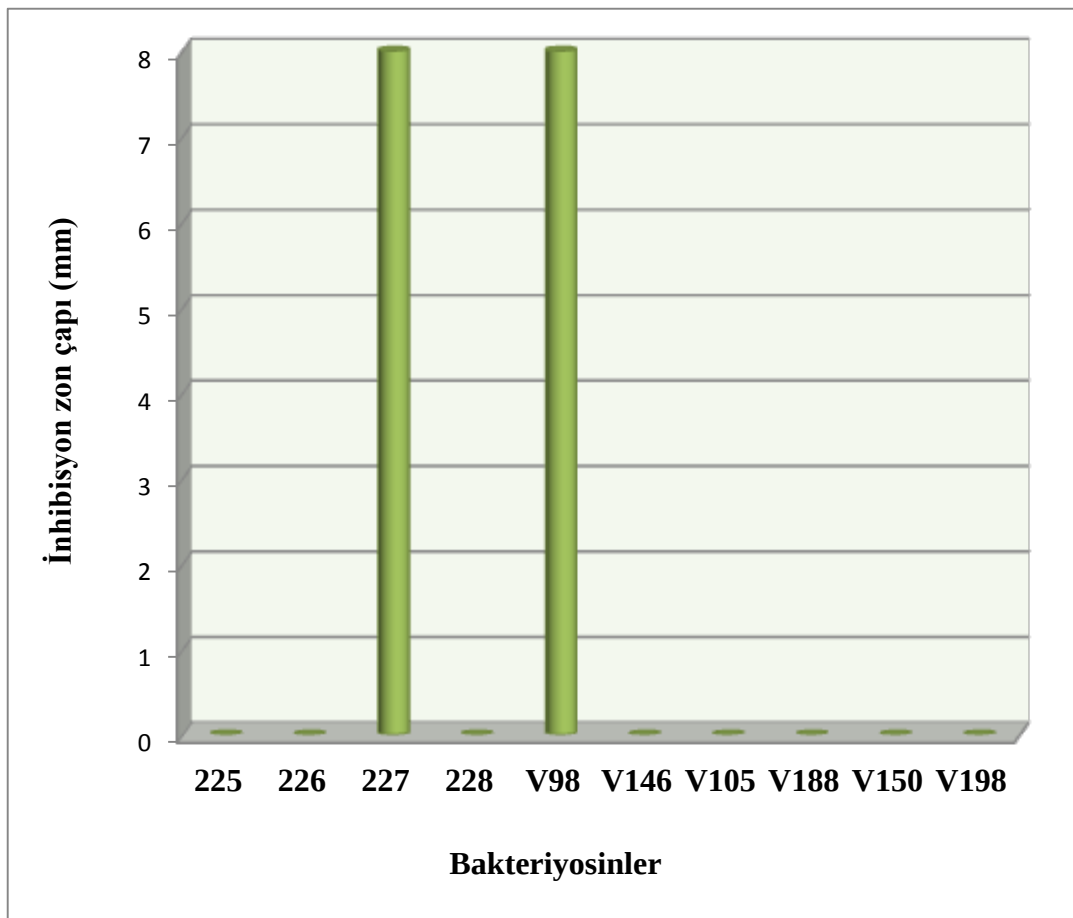
Şekil 4.5'de gıda kaynaklı ve Şekil 4.6'da klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, çalışmamızda kullanılan *E. coli* üzerine oluşturdukları inhibisyon zon çapları verilmiştir.



Şekil 4.5. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *E.coli*'ye karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.5'deki sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı bakteriyosinlerden L13 (*E. faecium*) suşunun *E.coli*'ye karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon çapının 6,5 mm olduğu, P18 (*E. faecium*) suşunun inhibisyon zon çapının 5,5 mm olduğu

belirlenmiş olup, YS1 (*E. faecium*), AS1 (*E. faecalis*), JS1 (*E. faecalis*), A1 (*E. faecalis*), H8 (*E. faecium*), E5 (*E. faecium*), LS1 (*E. faecalis*), NS1 (*E. faecalis*) suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *E.coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermediği görülmüştür. Genel olarak değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 2 tanesi (L13, P18) *E.coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 2 adet gıda kaynaklı enterokok suşlarından 2 tanesinin de *E. faecium* (L13, P18) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *E.coli*'ye karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.6'daki sonuçlar değerlendirildiğinde klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerden 227 (*E. faecalis*) ve V98 (*E. faecium*) suşlarının *E. coli*'ye karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon çapının 8 mm olduğu belirlenmiş olup, 225 (*E. faecalis*), 226 (*E. faecalis*), 228 (*E. faecalis*), V146 (*E. faecium*), V105

(*E. faecium*), V188 (*E. faecalis*), V150 (*E. faecium*) ve V198 (*E. faecium*) suşlarından elde edilen bakteriyosinler, *E. coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir. Genel olarak değerlendirdiğimizde klinik kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından 2 tanesi (227, V98) *E. coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Etki gösteren 2 adet klinik kaynaklı enterokok suşlarından 1 tanesinin *E. faecium* (V98) olduğu 1 tanesinin de *E. faecalis* (227) olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinleri değerlendirdiğimizde ise gıda kaynaklı enterokok suşlarından 2 tane suş (L13, P18) ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından da 2 adet suş (227, V98) *E. coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan hem gıda hem de klinik kaynaklı enterokok suşları Gram negatif bakteri olan *E.coli*'ye karşı zayıfta olsa antimikrobiyel etki göstermiştir.

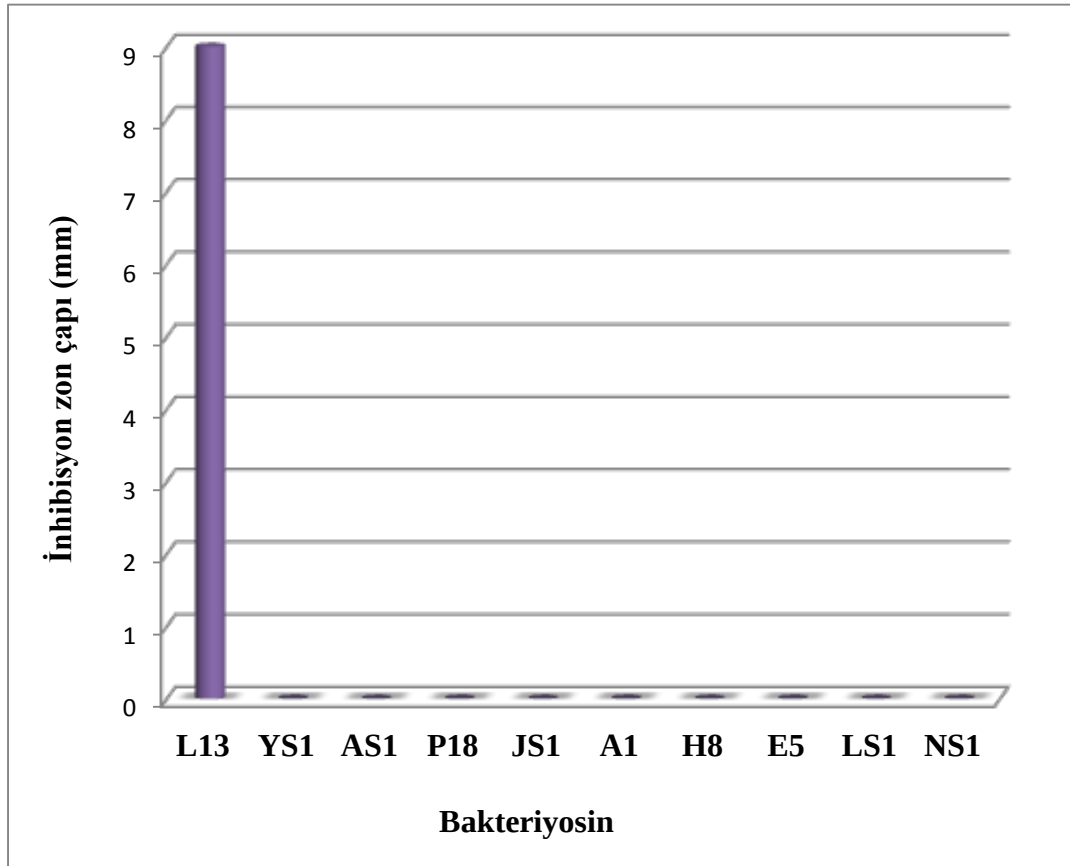
Strompfová ve ark (2003), 3200 AU/ml (0,10-0,25 ml oral doz) *Enterococcus faecium* EF 55 türünün ürettiği bakteriyosin ekstraktı ilavesinin Japon bildiricilerinin dışkılarındaki *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, *E. coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermiş olması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Todorov ve Dicks (2005), yaptıkları çalışmada, bu çalışmada olduğu gibi, *E. faecium* ST311LD tarafından üretilen bakteriyosinin *E. coli*'ye karşı inhibitör etki gösterdiğini saptamışlardır.

Abanoz (2014), yaptığı çalışmasında ise fermente süt ürünlerinden izole ettiği *E. faecalis* KT11'in kültür süpernatanın, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus* antibiyotik dirençli bakteriler de dahil olmak üzere bir çok Gram pozitif ve *E.coli*' de dahil Gram negatif bakteriye karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda gıda kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin , *E. coli*'ye karşı antimikrobiyel etki göstermiş olması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

4.1.4. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokok Suşlarından Elde Edilen Bakteriyosinlerin *S. aureus*'a Karşı Antimikrobiyel Etkileri

Şekil 4.7’de gıda kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin, çalışmamızda kullanılan *S. aureus* üzerine oluşturdıkları inhibisyon zon çapları verilmiştir.



Şekil 4.7. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *S.aureus*'a karşı inhibisyon etkileri

Şekil 4.7’deki sonuçlar değerlendirildiğinde, gıda kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerden sadece L13 (*E. faecium*) suşu *S.aureus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermiş olup inhibisyon zon çapı 9 mm olarak belirlenmiştir. Diğer gıda kaynaklı enterokok suşlarından YS1 (*E. faecium*), AS1 (*E. faecalis*), P18 (*E. faecium*), JS1 (*E. faecalis*), A1 (*E. faecalis*), H8 (*E. faecium*), E5 (*E. faecium*), LS1 (*E. faecalis*), NS1 (*E. faecalis*) suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin hiçbiri

S. aureus'a karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir. Genel olarak değerlendirdiğimizde gıda kaynaklı 10 adet enterokok suşlarından sadece 1 tanesi (L13) *S.aureus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermiştir.

Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin ise hiçbiri *S. aureus*' a karşı karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir.

Yürümez (2011), yaptığı çalışmasında Gayta örneklerinden izole edilen *E. faecium* OZ-E25 suşundan elde edilen bakteriyosinin, Gram pozitif olan *Staphylococcus aureus* ATCC6538 suşuna karşı etki göstermediğini belirtmiştir. Bu araştırmanın sonucu, bizim çalışmamızdaki klinik enterokoklardan elde edilen bakteriyosinin *S.aureus*'a karşı antimikrobiyel etki göstermemesi durumuyla örtüşmektedir. Yine Marekova ve ark (2007), yaptıkları çalışmada foseptik kaynaklı çevresel bir izolat olan *E. faecium* AL4'in *S. aureus* dahil çok sayıda farklı *Staphylococcus* türüne karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Belirtilen çalışmadan farklı olarak, bizim çalışmamızda ise klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerden hiçbiri *S. aureus* bakterisine karşı antimikrobiyel etki göstermemiştir.

Yine bir başka çalışmada Gharairi ve ark (2008), tarafından yaptıkları araştırma da Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium*'un MMT21 suşunun ürettiği enterosin A ve B' nin., laktik asit bakterilerinin yanısıra *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda gıda kaynaklı enterokların ürettikleri bakteriyosinlerin hemen hemen hepsi *S. aureus*'a karşı etki göstermemiş olsa da, inhibisyon etkisi gösteren tek bir suşumuzun bulunması (L13) bu çalışmayla benzer bir sonuç göstermektedir. Ancak suşların çoğunun, Gram pozitif olan *S. aureus*'a karşı etki göstermeyişi, çalışmamızda kullanılan üretici suşların yapısal genleriyle veya suşların gıda ortamlarına zayıf adaptasyonlarıyla alakalı olabilir. Bazı bakteriyosinler çok dar bir hedef hücre kitlesine sahiptirler, bu yüzden de LAB'nin antimikrobiyal aktivite testlerinde, üretici suşlara karşı duyarlı indikatör suşların seçimi kilit önem taşımaktadır (Nes ve ark, 2007). Diğer yandan, bakteriyosin üretimi ve aktivitesi; besiyerinin bileşimi, üretici bakterinin gelişme fazı, besiyeri başlangıç pH'sı, fermentasyon şekli (kesikli ve sürekli) ve inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısı

işlem, proteolitik enzimler ve depolama koşullarına da bağlıdır (Asutay, 2007; Türemiş, 2012).

4.2. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokoklardan Elde Edilen Bakteriyosinlerin Bazı Patojen Mikroorganizmalara Karşı Gösterdikleri Antimikrobiyel Etkilerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.1’de gıda kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara (*B. cereus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* ve *S. aureus*)’a karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Gıda Kaynaklı Enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları

	<i>B. cereus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
L13- <i>E. faecium</i>	6mm ^(*)	9.5mm ^(*)	6.5mm ^(*)	9mm ^(*)
P18- <i>E. faecium</i>	-	8.5mm ^(*)	5.5mm ^(*)	-
H8- <i>E. faecium</i>	-	-	-	-
E5- <i>E. faecium</i>	10mm ^(*)	7mm ^(*)	-	-
YS1- <i>E. faecium</i>	-	-	-	-
JS1- <i>E. faecalis</i>	7mm ^(*)	10mm ^(*)	-	-
NS1- <i>E. faecalis</i>	-	7mm ^(*)	-	-
A1- <i>E. faecalis</i>	13mm ^(*)	12mm ^(*)	-	-
LS1- <i>E. faecalis</i>	11mm ^(*)	-	-	-
AS1- <i>E. faecalis</i>	-	-	-	-

(*) Zon çapı

(-) İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere L13 (*E. faecium*)’den elde edilen bakteriyosinin çalışmamızda kullandığımız bütün patojenlere karşı antibakteriyel etki göstermiş olup inhibisyon zon çapları 6-9 mm arasında değiştiği saptanmıştır. P18 (*E. faecium*)’in *S. Enteritidis* ve *E. coli*’ye karşı, JS1 (*E. faecalis*) ve A1 (*E. faecalis*)’in *B. cereus* ve *S. Enteritidis*’e karşı, NS1 (*E. faecalis*)’in sadece *S. Enteritidis*’e karşı ve LS1 (*E. faecalis*)’in ise sadece *B. cereus*’a karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Gıda kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen

bakteriyosinler daha çok *S. Enteritidis* (7-12 mm) ve *B. cereus* (6-13 mm) üzerinde antibakteriyel etki göstermiştir. Buna karşın *E. coli* (5.5-6.5 mm) ve *S. aureus* (9 mm) üzerine daha az antimikrobiyel etki göstermiştir.

Gıda kaynaklı enterokok suşlarını, izole edildikleri ürün bazında değerlendirdiğimizde ise Hatay Peynirinden izole edilmiş olan L13 , Kaşar Peynirinden izole edilmiş P18, Antep Peynirinden izole edilmiş E5 ve Urfa Peynirinden izole edilmiş olan A1 ile tavuk etinden izole edilmiş olan JS1 ve LS1 suşlarının ve ev yapımı sucuktan izole edilen NS1 suşunun çalışmamızda kullanılan patojenlere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği görülmüştür. Genel olarak değerlendirdiğimizde, çeşitli peynirlerden izole edilen enterokok suşlarının çalışmamızda kullanılan patojenlere karşı daha fazla antimikrobiyel etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.'de klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara (*B. cereus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* ve *S. aureus*'a) karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Klinik Kaynaklı Enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara gösterdikleri inhibisyon zon çapları

	<i>B. cereus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
V150- <i>E. faecium</i>	-	9mm ^(*)	-	-
V105- <i>E. faecium</i>	-	12mm ^(*)	-	-
V98- <i>E. faecium</i>	-	-	8mm ^(*)	-
V146- <i>E. faecium</i>	-	-	-	-
V198- <i>E. faecium</i>	7mm ^(*)	9mm ^(*)	-	-
225- <i>E. faecalis</i>	-	-	-	-
226- <i>E. faecalis</i>	10mm ^(*)	14mm ^(*)	-	-
227- <i>E. faecalis</i>	8mm ^(*)	9mm ^(*)	8mm ^(*)	-
228- <i>E. faecalis</i>	-	11mm ^(*)	-	-
V188- <i>E. faecalis</i>	-	11mm ^(*)	-	-

(*) Zon çapı

(-) İnhibisyon zonu oluşmamıştır.

Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere klinik kaynaklı enterokok suşlarından V150 (*E. faecium*), V105 (*E. faecium*), 228 (*E. faecalis*) ve V188 (*E. faecalis*)' in sadece *S.*

Enteritidis'e, V98 (*E. faecium*) 'in sadece *E. coli*'ye, V198 (*E. faecium*) ve 226 (*E. faecalis*)' nin *B. cereus* ve *S. Enteritidis*'e, 227 (*E. faecalis*)' nin ise *B. cereus*, *S. Enteritidis* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bakteriyosinler en çok *S. Enteritidis*'e (9-14 mm) karşı antibakteriyel etki göstermiş olup, *B. cereus* (7-10 mm) ve *E. coli* (8 mm) üzerine daha az antibakteriyel etki göstermiştir. Klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin hiçbiri ise *S. aureus*' a karşı antibakteriyel etki göstermemiştir.

Genel olarak Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'yi değerlendirdiğimizde çalışmamızda kullanılan gıda ve klinik kaynaklı enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinler en çok *S. Enteritidis* daha sonra ise sırasıyla *B. cereus*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyel etki göstermiştir. L13 (*E. faecium*) suşu bütün patojenler üzerinde antimikrobiyel etki göstermiştir. Çizelge 4.1 ve 4.2'de görüldüğü üzere; toplamda 15 tane enterokok suşu, çalışmamızda kullanılan patojenlere karşı antimikrobiyel etki göstermiş olup bunlardan 8 tanesinin klinik kaynaklı enterokok suşu (226, 227, 228, V188, V105, V150, V198, V98) , 7 tanesinin ise gıda kaynaklı enterokok suşu (L13, P18, E5, JS1, A1, NS1, LS1) olduğu belirlenmiştir. Klinik ve gıda kaynaklı örneklerin antimikrobiyel etkinlikleri arasında ve tür bazında pek bir farklılık saptanmamıştır. Savadogo ve ark (2004), Süt ürünlerinden izole ettikleri bazı laktik asit bakterilerinden elde ettikleri bakteriyosinlerin bazı patojenler (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*) üzerine antimikrobiyel etkinliklerini inceledikleri çalışmada bizim çalışmamızdaki benzer etkinlik saptamışlardır. Elde ettikleri zon çapları 8-12 mm arasında değişmiştir.

Yürümez (2011), yaptığı çalışmasında da bebek gaytasından izole edilen *E. faecium* GM-1 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin de gıdalardan izole edilen enterokokların ürettikleri enterosinler ile benzer özellik gösterdiğini belirtmiştir.

Türemiş (2012), yaptığı çalışmasında gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin *Listeria monocytogenes* üzerine antimikrobiyel etkinliklerini araştırmış olup, gerek izole edildikleri kaynak ve gerekse de izole edildikleri bakteri suşunun türü bakımından farklılık göstermediğini belirtmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, 2009 ve 2011 döneminde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde takip edilen hastalara ait klinik kaynaklı enterokok suşları ve değişik gıdalardan elde edilen gıda kaynaklı enterokok suşlarından, kısmi saflaştırma ile elde edilen bakteriyosinlerin, bazı patojen bakteriler (*Escherichia coli* ve *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*) üzerine antimikrobiyel etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, suşun elde edildiği kaynağa göre karşılaştırılmıştır.

Çalışmada gıda ve klinik kaynaklı enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin büyük bir kısmı, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan ve Gram negatif bir bakteri olan *S. Enteritidis*, *E. coli* ile Gram pozitif bir bakteri olan *B. cereus*, karşı antimikrobiyel etki göstermiştir. Kullandığımız 20 adet enterokok suşlarından *S. Enteritidis*' e karşı 13 adet suş (L13, P18, JS1, A1, E5, NS1, 226, 227, 228, V105, V188, V150, V198) ; *B. cereus*'a karşı 8 adet suş (L13, JS1, A1, E5, LS1, 226, 227, V198) ; *E. coli*'ye karşı 4 adet suş (L13, P18, 227, V98) ve *S. aureus*'a karşı da 1 adet suş (L13) antimikrobiyel etki göstermiştir. Genel olarak değerlendirdiğimizde, çalışmamızda klinik ve gıda kaynaklı örneklerin antimikrobiyel etkinlikleri arasında ve tür bazında pek bir farklılık saptanmamıştır. Elde edilen bakteriyosinler en çok *S. Enteritidis*, daha sonra ise sırasıyla *B. cereus*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyel etki göstermiştir. Hatay peynirinden izole edilen gıda kaynaklı L13 (*E. faecium*) enterokok suşu çalışmamızda kullanılan tüm patojenlere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği için bu suşun virulans özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenerek endüstriyel alandaki kullanım potansiyellerinin belirlenmesi önerilmektedir.

Değişik gıdalardan elde edilen gıda kaynaklı enterokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinin, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis* gibi önemli gıda patojenlerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olması bu bakteriyosinin kısmi saflaştırılmış preparatlarının gıda muhafazasında kullanım potansiyeli olabileceğini düşündürmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda daha çok gıda kaynaklı enterokok suşlarının doğal koruyucu olarak kullanım potansiyelleri üzerinde

durulmuştur. Diğer yandan, klinik kaynaklı enterokokların da yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteriyosin üretmeleri, probiyotik olarak insanların ve hayvanların bağırsak florasında mikrobiyel dengeyi sağlamak için kullanılması, doğal koruyucu olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin inhibitör spektrumunun dar olması, duyarlı mikroorganizmalar içerisinde dayanıklı mutantların olması, gıda bileşiminin koruyucu etkisi, gıdada bulunan diğer antagonistik bileşikler veya gıda bileşenleri ile etkileşime girmeleri gibi faktörler bakteriyosinlerin gıda koruyucu olarak uygulanabilirliklerini sınırlamaktadır. Bu bağlamda bu çalışmanın devamında, kullanılan enterosinlerden antimikrobiyel etki gösterenlerin farklı pH, sıcaklık, depolama süresi, şeker-tuz (gıda bileşenini yansıtacak) vb. faktörler altında da antimikrobiyel etkinlikleri incelenmelidir.

Sonuç olarak; gerek klinik kaynaklı enterosinler gerekse de gıda kaynaklı enterosinler, antimikrobiyel etkinlikleri ile doğal koruyuculara bir alternatif oluşturabilirler. Ancak en iyi etkiyi gösteren enterosinin belirlenerek gıda güvenliği açısından farklı koşullardaki dayanımları ile genetik yapıları ayrıntılı olarak incelenmeli ve virülans özelliğe sahip olup olmadığı belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- ABANOZ, H., 2014. *Enterococcus faecalis* KT11'in Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi Üzerine Çalışmalar. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 1-110 s.
- ACHEMCHAM, F., MARTINEZ-BUENO, M., ABRINI, J., VALDIVIAL, E. and MAQUEDA, M. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 99; 141–150.
- ADAMS, M.R., 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria . *J. Biotechnol.* 68, 171-178s.
- AHMETOĞLU, N., 2011. *Bacillus cereus* KG5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 87 s.
- AKÇELİK, M., KAMURAN, A., ÇAKIR, I., DOĞAN, H.B., GÜRGÜN, V., AKKOÇ, N., ŞANLIBABA, P., AKÇELİK, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucular. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1-2) 59 – 70.
- ANANOU, S., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ A., VALDIVIA, E., 2007. Bactericidal Synergism Through Enterocin AS-48 and Chemical Preservatives Against *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 19-23.
- ANANOU, S., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M., GALVEZ, A., VALDIVIA, E., 2005b. Control of *Staphylococcus aureus* In Sausages By Enterocin AS- 48. *Meat Sci.*, 71: 549–556.
- ANAS, M., EDDINE, H. J., MEBROUK, K. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 3 (2): 39-49
- ANONYMOUS, 2004a. <http://www.konak.bel.tr/veteriner/gida.htm>
- ANONYMOUS, 2004b. <http://www.biltektubitak.gov.tr/canlilar/monera/bacillus.htm>

- ANONYMOUS, 2005a. <http://textbookofbacteriology.net/Staph.html>
- ANONYMOUS, 2006, http://www.gebelik-rehberi.com/diet_beslenme/gida.asp
- ANONYMOUS, 2007a, <http://www.forumakademi.org>
- ANONYMOUS, 2007b. web.inonu.edu.tr/iozerol/bakteriyoloji
- ASUTAY, D., 2007. Yöresel Bir Gıdadan İzole Edilen Bakteriyosin Üreten Bakterinin Teşhisi ve Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 89 s.
- ATANASSOVA, V., MEINDLY, A., RING, C., 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. International Journal of Food Microbiology; 68: 105-113
- AXELSSON, L. T., 1993. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In „Lactic Acid Bacteria”, Ed: Salmina, S., Wright, A.V., Marcel Dekker Inc., USA, 1-63.
- AYÇİÇEK, H., AYDOĞAN, H., KÜÇÜKKARASLAN, A., BAYSALLAR, M., BAŞUSTAOĞLU, AC., 2004. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. Food Control; 15: 253-259.
- BASANTA, A., SANCHEZ, J., GOMEZ-SALA, B., HERRANZ, C., HERNANDEZ, P.E., CINTAS, L.M., 2008. Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* L50, A Strain Producing Enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, Against Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria in Broth, Wort (hopped and unhopped), and Alcoholic and Non-alcoholic Lager Beers. Int. J. Food Microbiol., 125, 293–307.
- BAŞBÜLBÜL, G., 2009. Termofilik Bakterilerin Ürettiği Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 204s.
- BAUER, R., DICKS, L.M.T., 2005. Mode of Action of Lipid II-Targeting Lantibiotics. Int. J. Food Microbiol., 101, 201– 216.

- BEN BELGACEM, Z., ABRIOUEL, H., BEN OMAR, N., LUCAS, R., MARTINEZ-CANAMERO, M., GALVEZ, A., 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.
- BENKERROUM, N., GHOUATI, Y., GHALFI, H., ELMEJDOUB, T., ROBLAIN, D., JACOQUES, P., THONART, P., 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in The Model Cultured Milk (Iben) by in Situ Bacteriocin Production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Int. J. Dairy Technol.*, 55 (3) 145-151.
- BIROLLO, G.A., REINHEIMER, J.A., VINDEROLA, C.G., 2001. Enterococci vs Non-lactic Acid Microflora as Hygiene Indicators for Sweetened Yoghurt. *Food Microbiology*, 18, 597-604.
- BİLER, B., 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 1-130 s.
- BİLGİN, H., 2008. Fermente Süt Ürününden İzole Edilen Bakteriyosinojenik Bir Bakterinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 5-24 s.
- CAMPOS, C.A., RODRIGUEZ, O., MATA, P.C., PRADO, M., VELAZQUEZ, J.B., 2006. Preliminary Characterization of Bacteriocins From *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* Strains Isolated From Turbot (Psetta Maxima). *Food Research Intern.*, 39: 356–364.
- CARIOLATA, D., ANDRIGHETTO, C., LOMBARDI, A., 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.

- CEBRIAN, R., BANOS, A., VALDIVIA, E., PEREZ-PULIDO, R., MARTÍNEZ-BUENO, M., MAQUEDA, M., 2012. Characterization of Functional Safety and Probiotic Properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a New AS-48-Producer Strain. *Food Microbiology*, 30, 59-67.
- CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S., and LOIR, Y.L., 2008. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, (In press).
- CHEN, H., HOOVER, D.G., 2003. Bacteriosins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.
- CINTAS, L. M., CASAUS, P., FERNANDEZ, M. F., HERNANDEZ, P. E., 1998. Comparative Antimicrobial Activity Of Enterocin L50, Pediocin PA-1, Nisin A And Lactocin S Against Spoilage And Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289-298.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L., 2001. Bacteriocins: Safe, Naturel Antimicrobials for Food Preservation. *Int. J.Food Microbiol.*, 71, 1–20.
- COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P., 2005. Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Theurapotic Potential. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 6 (1): 61-75.
- CUTTER, CN., SIRAGUSA, GR., 1995. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection*, 58: 977–983.
- ÇAKIR, O., 2011. Erzincan Tulum Peynirinin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tespiti İle Bu Örneklerde Koagulaz(+) *S.aureus* ve *E.coli* O157:H7' nin Aranması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabil Dalı Yüksek Lisans Tezi, 53 s.
- DE JONG, A., VAN HIJUM, S. A. F. T., BIJLSMA, J. J. E., KOK, J., KUIPERS, O. P. 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*, 34: 273-279.

- DE KWAADSTENIET, M., TODOROV, S.D., KNOETZE, H., DICKS, L.M.T., 2005. Characterization of a 3 944 Dalton Bacteriocin Produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with Activity Against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 105:433–444.
- DE MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., FRANCO, B.D.G.M., 2002. Fundamentals and Perspectives for The Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria In Meat Products. *Food Reviews International*, 18(2-3): 191-208.
- DEEGAN, L.H., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extention. *Inter. Dairy J.* 16:1058-1071.
- DEMİR, E., 2014. Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretiminin Karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 66 s.
- DERAZ, S.F., KARLSSONİ, E.N., HEDSTORM, M., ANDERSSON, M.M., MATTIASSON, B., 2005, Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Journal of Biotechnology* 117: 343-354.
- DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J., 2004. New Preservation Technologies: Possibilities And Limitations. *Inter. Dairy J.*, 14: 273-285.
- DICKS L.M.T., HEUNİS, T.D.J., VAN STADEN, D.A., BRAND, A., SUTYAK NOLL, K. and CHİKİNDAS, M.L., 2011, Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, D. Drider and S. Rebuffat (eds.), DOI 10.1007/978-1- 4419-7692-5_19, p: 391-421.
- DİNÇER, E., KIVANÇ, M., KARACA, H., 2009, Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler, *Journal of Food*, 35, 55-62.
- DOĞAN, P., 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF Suşunda Bakteriyosin Üretiminden Sorumlu Genin Aktarımı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 64-79 s.

- DOMING, K., J., MAYER, H., K., KNEIFEL, W., 2003. Methods Used for The Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and Genotyping Criteria. International Journal of Food Microbiology, 88, 165-188s.
- ENNAHAR, S., ASOU, Y., ZENDO, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A., 2001. Biochemical And Genetic Evidence For Production Of Enterocins A And B By *Enterococcus faecium* WHE 81, International Journal of Food Microbiology, 70, 291-301s.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. and ISHIZAKI, A., 2000. Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev., 24; 85-106.
- ERGİNKAYA, Z., YURDAKUL, N.E., KARAKAŞ, A., 2007. *Enterococcus faecium* Ve *Enterococcus faecalis*'in Starter Ve Probiyotik Kültür Özellikleri. Gıda, 32 (3) : 137-142.
- EROL, İ., 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi: *Staphylococcus aureus*. Ankara: Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., 135-144
- FOULQUIE, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L., 2006. The Role And Application of Enterococci In Food And Health. Inf. J. Food Microbiol., 106: 1-24.
- FRANZ, C., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E., 1999. Enterococci At The Crossroads of Food Safety. Int. J. of Food Microbiol., 47: 1-24.
- FRANZ, C., M., A., P., MUSCHOLL-SILBERHORN, A., B., YOUSIF, N., M., K., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., HOLZAPFEL, W.H., 2001. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance Among Enterococci Isolated From Food. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 9, 4385-4389s.
- FRANZ, C., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., HOLZAPFEL, W. H., 2003. Enterococci In Foods a Conundrum for Food Safety. Int. J. Food Microbiol., 88: 105122.
- FRANZ, C.M.A.P., HUCH M., ABRIQUEL H., HOLZAPFEL, W., GALVEZ, A., 2011. Enterococci as Probiotics and Their Implications in Food Safety. International Journal of Food Microbiology Reviews 151, 128-140s.

- GALVEZ, A., ABRIOUEL, H., LOPEZ, R.L., OMAR, N.B., 2007. Bacteriocin Based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- GALVEZ, A., LUCAS, L. R., ABRIOUEL, H., 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Rev. in Biotechnology*, 28: 125-152.
- GARCIA, M.T., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N. B., PEREZ, R., GRANDE, M.J., CANAMERO, M.M. ve GALVEZ, A. 2004. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against '*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*' isolated from zucchini pure. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 731–737.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J.C. 2002. Two-Peptide Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *Biochimie.*, 84: 577–592.
- GHAMAT, A., 2010. Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23 Suşunun Ürettiği Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 21-54 s.
- GHARAIRI, T., FREE, J., BERJEAUD, J.M., MANAI, M., 2008. Purification and Characterisation of Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian Rigouta Cheese. *Food Control*, 19, 162-169.
- GILLOR, O., ETZION, A., RILEY, M. A., 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (4): 591-606.
- GILLOR, O., NIGRO, L.M. and RILEY, M.A. 2005. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11; 1065-1075.
- GIRAFFA, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26. 163 171.
- GIRAFFA, G., 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2-3):215-222.
- GRANDE, M.A.J., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., OMAR, N.B., MAQUEDA, M., MARTINEZ BUENO, M., MARTINEZ-CANAMERO, M., VALDIVIA, E., GALVEZ, A., 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* In Fruit Juices By Enterocin AS-48, *Inter. J. of Food Microbiol.*, 104 289– 297

- GRAVESEN, A., JYDEGAARD AXELSEN, A. M., MENDES DA SİLVA, J., HANSEN, T. B., KNOCHER, S. 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 68 (2): 756– 764.
- GUDER, A., WIEDEMANN, I. and SAHL H. G., 2000, Posttranslationally modified bacteriocins the lantibiotics, Peptide Science, Volume 55, Issue 1, pages 62– 73.
- GUTIERREZ, G.L., FERNANDEZ, M.M., DE MARZI, M.C., MALCHIODI, E.L., MANGHI, M.A., 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. J. Appl. Microbiol., 100:123-134.
- GÜLBANDILAR, A., 2006. Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi Eskişehir
- GÜLER, S., 2006. Tarçının Sütteki *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* Bakterisine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Gebze.(2)
- GWEN, M., 2006. Maintaining Freshness in Cultured Dairy Products. Cultured DairyProducts Conference Minneapolis. http://www.idfa.org/meetings/presentations/culturedairy06_meyer.pdf. (25.04.2007).
- HAJIKHANI, R., BEYATLI, Y., ASLIM, B., 2007, Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. International Journal of Dairy Technology, Vol. 60, No. 2, 105-108.
- HALKMAN, A.K., KADİR, K.D., KULEAŞAN, H., ÖZKAYA, D.F.,TUNÇİL, N., TÜKEL, Ç., 2000. SİM Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 522s.
- HAUBEN, K.J.A., WUYTACK, E.Y., SOONTJENS, C.C.F., MICHIELS, C.W. 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. J.Food Prot., 59, 350–355.

- HENG, N.C., K. ve TAGG, J.R., 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology* 4, doi:10.1038/nrmicrol1273-c1.
- HORN, N., FERNANDEZ, A., DODD, H.M., GASSON, M.J. and RODRIGUEZ, J., 2004. Nisin – controlled production of pediocin PA-1 and colisin V in nisin and non-nisinproducing *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 70; 5030-5032.
- HUGAS, M., GARRIA, M., AYMERICH, M.T., 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3):223-233.
- INOĞLU, ZN., TUNCER, Y., 2013. Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Journal of Food Safety*, 33, 369-377.
- IVANOVA, I., KABADJOVA, P., PANTEV, A., DANOVA, S., and DOUSSET, X., 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza bulgarian traditional cereal beverage. *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Khimiya*, Vol. 41, No. 6.
- İŞLEROĞLU, H., 2006. Yöresel peynirden izole edilen gram pozitif bir bakterinin ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisans Tezi, Tokat.
- İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., DEMİRPENCE, Y., YILDIRIM, M. 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik Ve Fonksiyonel Özellikleri İle Patojenitesi. *Akademik Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, 6(3), 16 – 26.
- İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M., 2005. Sınıf IIa bakteriyosinlerin biyosentezi, yapısı ve antimikrobiyal aktivitesi. *Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı*. İzmir.
- KALELİ, D., ÖZKAYA, F., 2000. *Bacillus cereus*. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları* Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaacılık Ltd., Ankara. 395-401s.

- KALENDER, H., ŞEN, S., 2008. Tavuk Etleri Ve Tavuklardan İzole Edilen *Salmonella enterica* Subsp. *Enterica* Serovar *Enteritidis* Suşlarının Faj Tiplendirilmesi Ve PulsedField Gel Electrophoresis İle Analizi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 34, 15-24.
- KALKAN, S., HALKMAN, K., 2006. *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 4(1): 1-11.
- KARAGÜL B., 2010. Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 1-87 s.
- KARAKAŞ, A., 2005. Beyaz Peynir ve Fermente Sucuklardan *Enterococcus faecium*'un İzolasyonu ve Tanımlanması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- KAWAI, Y., Ishii, Y., UEMURA, K., KITAZAWA, H., SAITO, T. and ITOH, T., 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin, Food Microbiology, 18: 407-415.
- KAYSER, F. H., 2003, Safety aspects of Enterococci from the medical point of view, International Journal Food Microbiology, 88,255– 262.
- KILINÇ, Ü., AYDIN, F., 2006. Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. Sağlık Bil Derg, 15: 35–40.
- KLAENHAMMER, T.R., 1993. Genetics Of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12, 39–86.
- KLEIN, G., 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci From Food And The Gastrointestinal Tract. Int.J. Food Microbiol., 88: 123-131.
- KLIBI, N., JOUINI, A., ROJO-BEZARES, B., MASMOUDI, A., RUIZ-LARREA, F., BOUDABOUS, A., TORRES, C., 2008. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Clinical Enterococcal Isolates of Tunisia. World J Microbiol Biotechnol., 24:653–657.

- KONEMAN, EW., ALLEN, SD., JANDA, WM., 2006. Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott, 167-210.
- KOPENON, O., 2004. Studies of producer self – protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, (Doctoral Dissertation), Institute Of Biotech. And Department of Appl. Chemistry And Microbiol., Helsinki.
- KORAL, G., 2011. Bozadan İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GYL32 Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 29-63 s.
- KORKMAZ, M., 2012. Bazı Yemek İşletmelerinin Üretim Zincirinde *Staphylococcus aureus* ve Toksininin Aranması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 41 s.
- KÖSEAHMETOĞLU, T., 2011. *Allium Scoradoprasum* (Körmen) ve *Allium Sativum* (Sarımsak)' un *Listeria Monocytogenes*, *Escherichia Coli* =157:H7, *Salmonella* Enteritidis Üzerine Etkileri. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 54 s.
- KÖSEOĞLU, V. K., 2007, Model sistemlerde laktik asit bakterilerinin bazı patojenler üzerine antibakteriyal etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 59 s.
- KRUSZEWSKA, D., SAHL, H.G., BIERBAUIM, G., PAG, U., HYNES, S.O., LJUNGH, A.S., 2004. Mersacidin Eradicates Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Rhinitis Model. J. Antimicrob. Chemother., 54 (3): 648–653.

- KUHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L., G.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M.; AARESTRUP, F.; SEFRTH, A., M.; BLANCH, A., R.; VILANOVA, X.; TAYLOR, H.; CAPLIN, J.; MORENO, M., A.; DOMÍNGUEZ, L.; HERRERO, H.; MOLLBY, R., 2003. Comparison of Enterococcal Populations in Animals, Humans and The Enviroment-A European Study. International Journal of Food Microbiology, 88, 2-3, 133-145.
- KURT, Ş., ZORBA, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. YYÜ Vet. Fak. Dergisi, 2005, 16 (1):77-83.
- LAUKOVA, A., CZIKKOVA, S., DOBRANSKY, T., BURDOVA, O. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by Enterocin CCM4231 In Milk Products. Food Microbiol., 16: 93-99.
- LEE, N.K., PAIK, H.D., 2001. Partial Characterization of Lacticin NK24, a Newly Identified Bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. Food Microbiol., 18:17-24.
- LEROY, F., MORENO, MRF, VUYST, L., 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, An Interesting Bacteriocin Producer to be Used as a Co-culture in Food Fermentation. Int. J. Food Microbiol., 88: 235-240.
- LINAJE, R., COLOMA, M., D., PEREZ-MARTINEZ, G., ZUNIGA, M., 2004. Characterization of Faecal Enterococci from Rabbits for the Selection of Probiotic Strains. Journal of Applied Microbiology. 96, 761-771s.
- LIU, W., HANSEN, J. N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 551-2558.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J. M., 2006. Mikroorganizmaların Biyolojisi (Prof. Dr. Çökmüş, C. Ed.), Ankara.
- MAREKOVA, M., LAUKOVA, A., DE VUYST, D.L., SKAUGEN, M., NES, IF., 2003. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Enviromental Strain *Enterococcus faecium* EK13. J. Appl. Microbiol., 94(3):523-30.

- MC AULIFFE, O., ROSS, R. P. and HILL, C., 2001. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis And Mode of Action. FEMS Microbiology Reviews, 25; 285-308.
- MOHANKUMAR, A., MURUGALANTHA, N. 2011. Characterization and Antibacterial Activity of Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. International Journal of Biology, 3 (3).
- MONCHEVA, P., TISHKOV, S. and CHIPEVA, V., 2001, Innovative aspects in biotechnology of prokaryotes, Sofia-Bulgaria, 206p.
- MONTVILLE, T. J., WINSKOWSKI, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In "Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers", M. P. Doyle, L.R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.) ASM, Washington D.C.
- MORENO, F., CALLEWAERT, R., DEVREESE, B., BEEUMEN, J.V, VUYST, D.L., 2003. Isolation and Biochemical Characterisation of Enterocins Produced By Enterococci From Different Sources. Journal of Applied Microbiology, 94: 214– 229.
- MORGAN S M, ROSS R P, BERESFORD T, HILL C (2000): Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. Journal of Applied Microbiol, 88:414-20.
- NAMDARI, H., 1998. Application of PCR for the Characterisation of Enterococci. Clinical Microbiology Newsletter, Vol. 20, No.11, 91-93.
- NAWAZ, S. K., RIAZ S., HASNAIN, S. 2009. Screening for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteriocin producing bacteria. African Journal of Biotechnology, 8 (3): 365-368.
- NEMADE, S.P., MUSADDIQ, M., 2012. Preliminary Detection of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by *Enterococcus* species Isolated From Different Sources. Bioscience Discovery, June 3(2): 149-154.
- NES, I. F., HOLO, H., FIMLAND, G., HAUGE, H., NISSEN-MEYER, J., 2002. Unmodified Peptide-bacteriocins (Class II) Produced by Lactic Acid Bacteria. In: Peptide Antibiotics; Discovery, Modes of Action and Applications. Marcel Dekker, Inc., New York, 81-115.

- NES, I.F., DIEP, D.B., HOLO, H., 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* And *Enterococcus*. *J. Bacteriol* 189: 1189-1198.
- NES, I.F., HOLO, H. 2000. Class II Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolimers (Peptide science)*. 55:50-60.
- NORMANNO, G., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*; 115: 290-296.
- OGIER, J. C., SERROR, P., 2008. The enterococcus genus, *International Journal Food Microbiology*, 126, 291-301.
- OKEREKE, A. and MONTVILLE, T.J. 1991. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 54; 349-353.
- OSMANAĞAOĞLU, Ö., 2003. Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27; 471-480.
- ÖZDEMİR, G.B., ORYAŞIN, E., BIYIK, H.H., ÖZTEBER, M., BOZDOĞAN, B., 2011. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. *Indian J Microbiol* (Apr-June), 51(2):182–187.
- ÖZDEMİR, H., KÜPLÜLÜ, Ö., ÇELİK, T. H., 2002. Türk Fermente Sucuğundan Elde Edilen Laktobasillerin Antibakteriyel Ekilerinin Saptanması. *Gıda*, 27 (6): 539-544.
- ÖZDEN TUNCER, B., AY, Z., TUNCER, Y., 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turk J Biol*, 37, 443-449.
- PAPAGIANNI, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotec. Advances*. 21:465-499.

- PARK, S.H., ITOH, K., FUJISAWA, T., 2003. Characteristics and Identification of Enterocins Produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. J. Appl. Microbiol., 95, 294–300.
- PETERS, J., MAC, K., WISHMANN-SHAUER, H., KLEIN, G., 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.
- REDDY, K. V., ARANHA, C., GUPTA, S. M., YEDERY, R. D. 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. Reproduction, 128: 117–126.
- REUNANEN, J., 2007. Lantibiotic nisin and its detection methods. Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki. 42s. Helsinki.
- RODRIGUEZ, J.M., MARTINEZ, M.I., HORN, N., DODD, H.M., 2003. Heterologous Production of Bacteriocins by Lactic Acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 80:101-116.
- ROSS, PR, MORGAN, S., HILL, C., 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future. International Journal of Food Microbiology, 79(1-2):3-16.
- ROSSLAND, E., LANGSRUD, T., GRANUM, P.E. ve SORHAUG, T., 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. Int. J. Food Microbiol., 98, 193-200.
- SAAVEDRA, L., TARANTO, MP., SESMA, F., VALDEZ, GF., 2003. Homemade Traditional Cheeses for The Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains. Int. J. Food Microbiol., 88:241-245.
- SABIA, C., NIEDERHAUSERN, S., GUERRIERI, E., MESSI, P., ANACARSO, I., MANICARDI, G., BONDI, M., 2007. Detection of Bacteriocin Production and Virulence Traits in Vancomycin-Resistant Enterococci of Different Sources. Journal of Applied Microbiology ISSN, 1364-5072.

- SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M.D., REA, M.C., LOMBARDI, A., COGAN, T.M., KALANTZOPOULOS, G. and TSAKALIDOU, E., 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *International Dairy Journal*, 11; 621–647.
- SARIKA, A. R., LIPTON, A. P., AISHWARYA, M. S., and DHIVYA, R. S., 2011, Efficacy of Bacteriocin of *Enterococcus faecalis* CD1 as a Biopreservative for High Value Marine Fish Reef Cod (*Epinephelus diacanthus*) under Different Storage Conditions *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1 (4): 18-24.
- SAVADOGO, A., OUATTARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., TRAORE, A.S., 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3): 174-179.
- SAVADOGO, A., OUATTARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., TRAORE, A.S., 2006. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria a Minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- SCHLEIFER, KH., BELL, JA., 2009. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. In William B. Whitman ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume 3 The Firmicutes*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer : 392-401.
- SCHNURER, J., MAGNUSSON, J., 2005. Antifungal Lactic Acid Bacteria as Biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16: 70–78.
- SEÇKİN, A. K., BALADURA, E., 2010, Gıdaların muhafazasında bakteriyosin ve bakteriyofaj uygulamaları, *Gıda*, 35 (6): 461-467.
- SEMEDO, T., SANTOS, M.A., LOPES, M.F.S., FIGUEIREDO MARQUES, J.J., BARRETO CRESPO, M.T., TENREIRO, R., 2003. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 13–22.
- SIELADIE, D. V., ZAMBOU. N. F., KAKTCHAM, P. M., CRESCI, A., FONTEH, F. 2011. Probiotic properties of lactobacilli strain isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9: 12-28.

- SIT, C.S., VEDERAS, J.C., 2008. Biochemistry and Cell Biology: 86, 116.
- SMITH-PALMER, A., STEWART, J. and FYFE, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463- 470.
- SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., BOTSOGLOU, N., 2008. The Antimicrobial Effect of Thyme Essential Oil, Nisin, and Their Combination Against *Listeria monocytogenes* in Minced Beef During Refrigerated Storage. *Food Microbiology*, 25 (1): 120-127.
- SPARO, M.D., CASTRO, M.S., ANDINO, P.J., LAVIGNE, M.V., CERIANI, C., STEFFEN, T., 2005. Natural Dairy Safety in Dairy World. Food Protection Symposium Sao Polia, June 2005, Brazil.
- STILES, M.E., HOLZAPFEL, W.H., 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
- STROMPFOVA, V., LAUKOVA, A., MUDRONOVA, D., 2003. Effect of Bacteriocin-like Substance Produced by *Enterococcus faecium* EF55 on the Composition of Avian Gastrointestinal Microflora. *Acta Vet. Brno*, 72, 559-564s.
- TAGG, J.R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.*, 199; 13-16.
- TAHIRI, I., DESBIENS, M., BENECH, R., KHEADR, E., LACROIX, C., THIBAUT, S., OUELLET, D., FLISS, I., 2004. Purification, Characterization and Amino Acid Sequencing of Divergicin M35: a Novel Class IIa Bacteriocin Produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.*, 97 (2): 123–36.
- TAŞ, E., 2008. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri ve Baharatların Bazı Gıda Patojenleri Üzerine İnhibisyon Etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 72 s.
- TEIXEIRA, LA., FACKLAM, RR., 2003. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ. Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition, Washington. ASM Pres. pp: 422-433.

- TEKTEMUR, A., 2010. Pastörize Sütlerde *Bacillus cereus* Varlığının Tespiti Üzerine Bir Araştırma. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 35 s.
- TERKURAN, M., 2013. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokokların Vankomisin Direnç Özelliklerinin, Genetik Orjinlerinin ve Virülans Faktörlerinin Karşılaştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 80 s.
- THEPPANGNA, W., MURASE, T., TOKUMARU, N., CHIKUMI, H., SHIMIZU, E., OTSUKI, K., 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. J. Vet. Med. Sci., 69:1235-1239.
- THOMAS, LV., WIMPENNY, JWT., 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. App Environ Microbiol, 62: 2006-2012.
- TODOROV, S.D., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. Brazilian Journal of Microbiology, 40, 209- 221.
- TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2005a. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. J. Basic Microbiol. 45(4): 312–322.
- TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. 2005b. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiol. Res. 161(2): 102-108.
- TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T., 2005. Characterization of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Spoiled Black Olives. J. Basic Microbiol., 45(4), 312–322.
- TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T., 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. Process Biochemistry, 41, 11–19.

- TODOROV, S.D., NYATI, H., MEINCKEN, M., DICKS, L.M.T., 2007. Partial Characterization of Bacteriocin AMA-K, Produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K Isolated from Naturally Fermented Milk from Zimbabwe. Food Control, 18, 656–664.
- TOIT, M., FRANZ, C.M.A.P., DICKS, L.M.T., HOLZAPFEL, W.H., 2000. Preliminary Characterization of Bacteriocins Produced By *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated From Pig Faeces. J. of Appl. Microbiol., 88: 482–494.
- TROTTER, M., MC AULIFFE, O. E., FITZGERALD, G. F., HILL, C., ROSS, R. P. and COFFEY, A., 2004, Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02, Appl. Environ. Microbiol., 70; 34-42.
- TÜREMİŞ, A., 2012. Klinik ve Gıda Kaynaklı Enterokoklar tarafından üretilen Bakteriyosinlerin Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 1- 95s.
- TWOMEY, D., ROSS, R.P., RYAN, M., MEANY, B., HILL, C., 2002. Lantibiotics Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure, Function and Application. Antonie van Leeuwenhoek, 82: 165-185.
- TYÖPPÖNEN, S., PETAJA, E., MATTILA-SANDHOLM, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Intr. J. Food Microbiol. 83: 233– 244.
- UĞUR, M., NAZLI, B., BOSTAN, K. (2003). *Gıda hijyeni.*, Teknik yayınları, İstanbul.
- ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F., 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı-İzmir, 605 s.
- VADYVALOO, V., AROUS, S., GRAVESEN, A., HECHARD, Y., CHAUHAN-HAUBROCK, R., HASTINGS, J.V., RAUTENBACH, M., 2004. Cell-Surface Alterations in Class IIa Bacteriocinresistant *Listeria monocytogenes* Strains. Microbiology, 150: 3025–3033.

- VADYVALOO, V., HASTINGS, J. W., VAN DER MERWE, M. J., RAUTENBACH, M. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. Appl. Environ. Microbiol., 68 (11): 5223–5230.
- VALENZUELA, A.S., OMAR, N.B., LOPEZ, R.L., ABRIOUEL, H., LOPEZ, R.L., VELJOVIĆ, K., CANAMERO, M.M., TOPISIRROVIC, M.K.L., GALVEZ, A., 2009. Virulence Factors, Antibiotic Resistance and Bacteriocins in Enterococci from Artisan Foods of Animal Origin. Food Control Volum 20, Issue 4, pages 381-385.
- VIGNOLO, G., PALACIOS, J., FARIAS, M.E., SESMA, F., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. and OLIVER, G., 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. Current Microbiology, 41; 410-416.
- VILAS, A.M., 2011. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Microbiology Book Series Number 3 Vol. 2, 1330-1339.
- VON MOLLENDORFF, J.W., TODOROV, S. D., DICKS, L. M. T., 2006. Comparison of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Boza, a Cereal-based Fermented Beverage from the Balkan Peninsula. Curr. Microbiol., 53(3): 209-216.
- VUYST, D.L., MORENO, M.R., REVETS, H., 2003. Screening for Enterocins and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. International Journal of Food Microbiology, 84, 299– 318.
- XIE, Y., AN, H., HAO, Y., QIN, Q., HUANG, Y., LUO, Y., ZHANG, L., 2011. Characterization of an Anti-*Listeria* Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 Isolated From Koumiss, a Traditionally Fermented Dairy Product From China. Food Control 22, 1027-1031.
- YALÇIN, A.N., 2009. Yoğun Bakım Ünitesinde Antibiyotik Kullanımı ve Direnç Sorununa Genel Bakış. Ankem Dergisi 23(Ek 2):136-142.

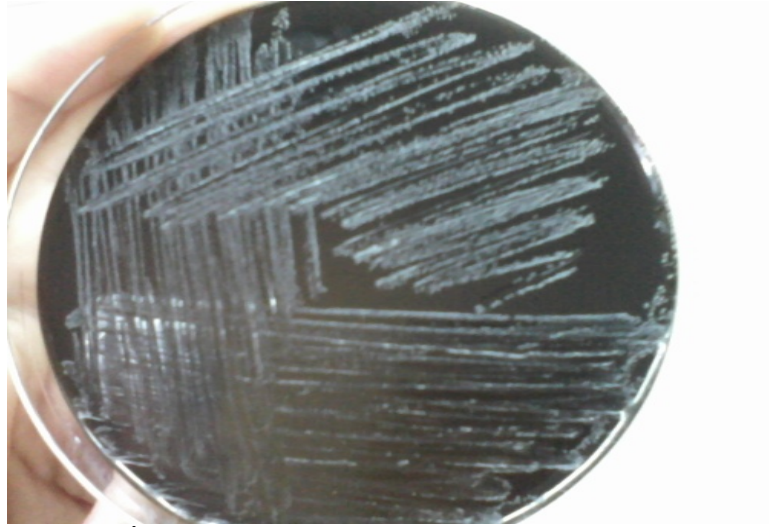
- YAMATO, M., OZAKİ, K., OTA, F., 2003. Partial Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. Microbiology Res., 158, 169–172.
- YILDIRIM, M., 2007. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen İnfeksiyonlar. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2: 46-52.
- YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M., 2000. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. Süt Mikrobiyolojisi Ve Katkı Maddeleri Sempozyumu. 247-253 S. 22-23 Mayıs Tekirdağ.
- YOON, M.Y., KIM, Y.J., HWANG, H.J., 2008. Properties and Safety Aspects of *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Chungkukjang, a Fermented Soy Product. Food Science and Technology, Vol., 41, 925-933.
- YÜRÜMEZ, E., 2011. Gayta Örneklerinden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 123s.

ÖZGEÇMİŞ

31/01/1986 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana’da tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde Lisans eğitime başladı ve 2008 yılında öğrenci değişim programı ile lisans eğitiminin 2008 güz dönemini Polonya’da University of Technology and Life Sciences’da tamamladı. 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans Eğitime başladı. 2012 Haziran ayında İslahiye Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğüne gıda mühendisi olarak atandı ve hala aynı yerde gıda kontrol görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.

EKLER

EK 1. Kısmi Saflaştırma aşamaları ve disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon görüntüleri



Resim 1.1. Enterokok İzolatı



Resim 1.1.a. 250mL'lik MRS Broth'da 37°C'de 48 saatte gelişen enterokok kültürleri



Resim 1.1.b. Gelişen kültürlerin 10.000 devir’de 4°C’de 30 dakika santrifüj işlemi



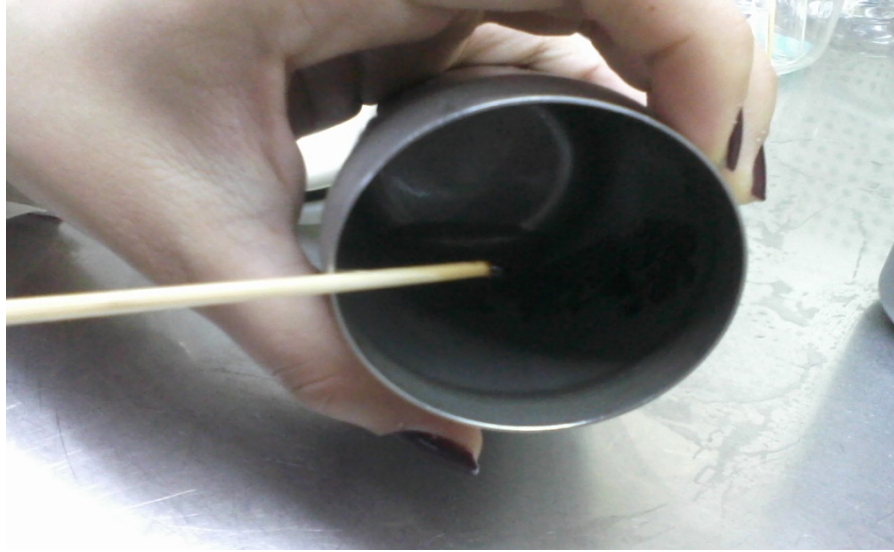
Resim 1.1.c. Süpernatant eldesinin 10 N sodyum hidroksitle pH 7’ye ayarlama işlemi



Resim 1.1.d. Süpernatant içlerine % 40’lık amonyum sülfat ilavesi



Resim 1.1.e. 13.000 devir’de 4°C’de 45 dakika santrifüj işlemi



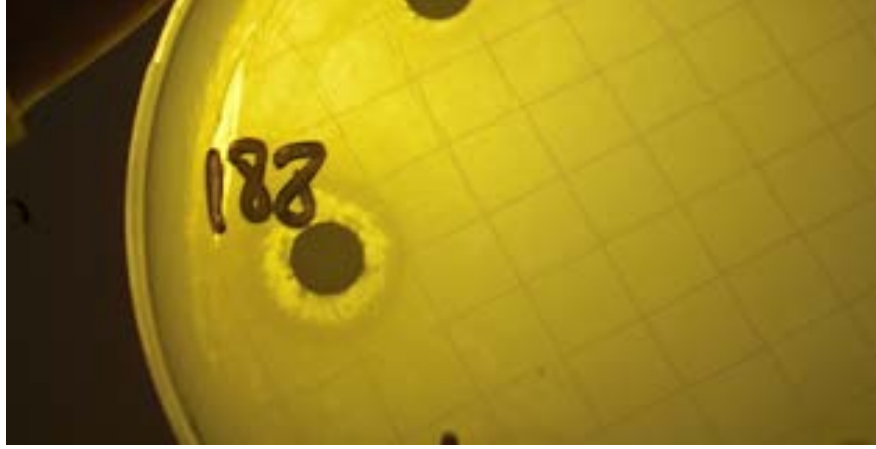
Resim 1.1.f. Süspanse edilmemiş kısmi bakteriyosin.



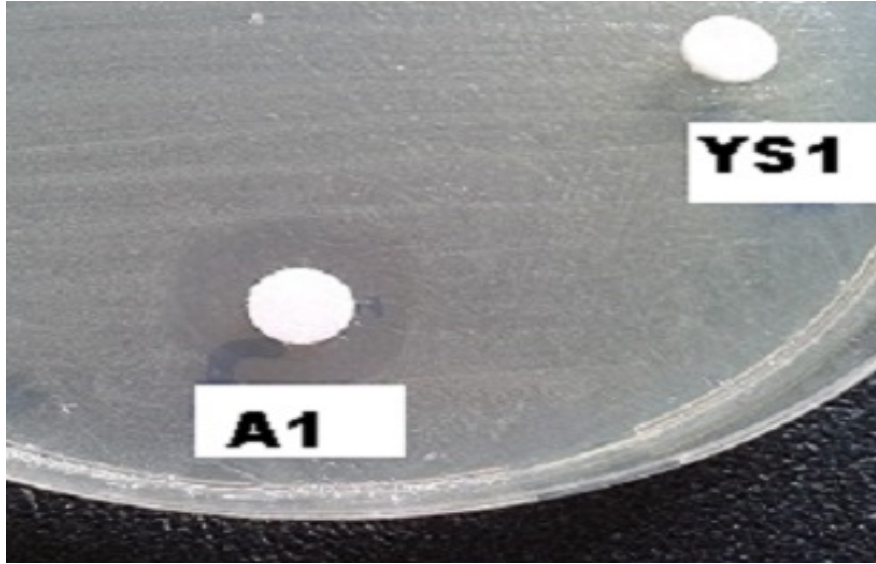
Resim 1.1.g. Süspanse edilmiş bakteriyosin ekstraktı



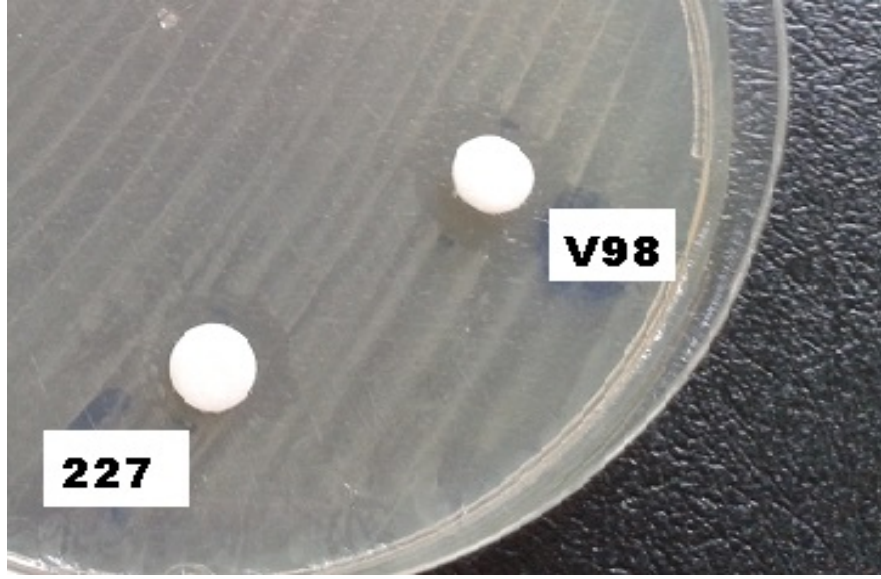
Resim 2.1. Test mikroorganizması içeren besiyeri yüzeyin yerleştirilen kağıt disklerin (Oxoid CM0998) üzerine damlatılan bakteriyosin örneği.



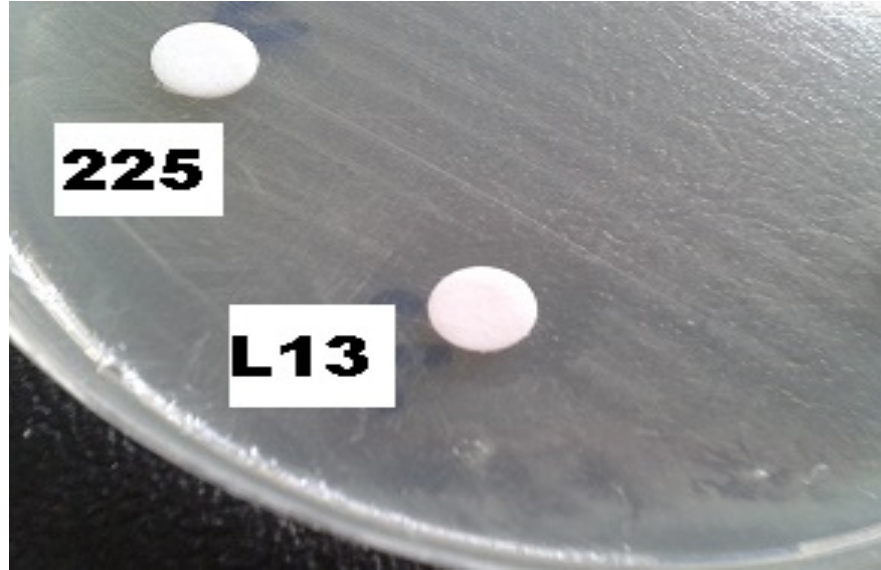
Resim 2.1.a. V188 enterokok suşundan elde edilen bakteriyosinin *S. Enteritidis*'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonu



Resim 2.1.b. A1 enterokok suşundan elde edilen bakteriyosinin *B. cereus*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu



Resim 2.1.c. V98 ve 227 enterokok suşlarından elde edilen bakteriyosinlerin *E.coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları



Resim 2.1.d. L13 enterokok suşundan elde edilen bakteriyosinin *S.aureus*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu