



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE
TEKNOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



**CLOSTRIDIODES DIFFICILE'NİN PASTÖRİZE SÜT,
YOĞURT VE KEFİRDEKİ DAVRANIŞI VE NİSİNİN ETKİSİ**

AYŞE GÜL DAL

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2024

AYŞE GÜL DAL

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANA BİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2024



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERFAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANA BİLİM DALI



**CLOSTRIDIODES DIFFICILE'NİN PASTÖRİZE SÜT, YOĞURT VE
KEFİRDEKİ DAVRANIŞI VE NİSİNİN ETKİSİ**

Ayşe Gül DAL

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN

Prof. Dr. Recep ÇIBİK

HSGYAD/A/20/A3/PI/1923- TAGEM

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “*Clostridioides difficile*’nin Pastörize Süt, Yoğurt ve Kefirdeki Davranışı ve Nisinin Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Ayşe Gül DAL
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

12/12/2023

Adı Soyadı: Ayşe Gül DAL

Ana Bilim Dalı: Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı

Tez Konusu: *Clostridioides difficile*'nin Pastörize Süt, Yoğurt ve Kefirdeki Davranışı ve Nisinin Etkisi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	■	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	■	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	■	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	■	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	■	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	■	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	■	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Recep ÇIBİK

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYANI	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET	VII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Clostridioides difficile</i> (<i>C. difficile</i>).....	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Özellikleri	4
2.1.3. Kültür ve Koloni Morfolojisi.....	4
2.1.4. Spor Biyolojisi ve Yapısı.....	6
2.1.4.1. Sporların Dayanıklılığı.....	8
2.1.4.2. Spor Çimlenmesi.....	9
2.1.4.3. Spor İnhibisyonu	10
2.1.5. Toksin Varlığı.....	11
2.1.6. Antibiyotik Direnci.....	12
2.1.7. Patojenite ve Epidemiyoloji.....	13
2.2. Gıdalarda Bulunma Durumu.....	14
2.2.1. Gıda Zincirindeki Olası Kaynak ve Kontaminasyon Yolları	15
2.2.2. Gıdalardaki Hayatta Kalması ve Çoğalması.....	16
2.2.3. Gıdalardaki Yaygınlığı ve Tiplendirme Çalışmaları	17
2.3. Süt ve Süt Ürünleri	18
2.3.1. Pastörize Süt	20
2.3.2. Yoğurt.....	21
2.3.3. Kefir.....	22
2.4. Probiyotikler ve <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarında Kullanımı	23
2.5. Nisin.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. <i>C. difficile</i> Suşu.....	27
3.1.2. Yoğurt Kültürü.....	27
3.1.3. Kefir Kültürü	27
3.1.4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar.....	28
3.1.5. Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar.....	29
3.1.6. BHI-YST-CC Besiyeri.....	30
3.1.7. Nisin.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. <i>C. difficile</i> Suşunun Canlandırılması ve Doğrulanması.....	31
3.2.1.1. <i>C. difficile</i> Hızlı Test Kitinin Prensibi ve Uygulanması.....	31
3.2.1.2. PZR Analizi.....	32
3.2.1.3. Sekans Analizi.....	33

3.2.2. Sütün Pastörizasyonu, Sporların Süte İnokülasyonu ve Nisin İlavesi.....	33
3.2.3. Yoğurt Üretimi ve Spor İnokülasyonu	34
3.2.4. Kefir Üretimi ve Spor İnokülasyonu	34
3.2.5. Spor Stok Süspansiyonu Eldesi	34
3.2.6. Spor Yapılarının İncelenmesi ve Spor Sayımı	35
3.2.7. Mikrobiyolojik Analizler	35
3.2.7.1. <i>C. difficile</i> Sayımı	36
3.2.7.2. Toplam Aerobik Mezofil Bakteri (TAMB) Sayımı	36
3.2.7.3. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Sayımı	37
3.2.7.4. Maya Sayımı	37
3.2.8. Fiziksel ve Kimyasal Analizler.....	37
3.2.8.1. pH.....	37
3.2.8.2. Titrasyon Asitliği	37
3.2.8.2.1. Çiğ Sütün ve Pastörize Sütün Titrasyon Asitliği.....	37
3.2.8.2.2. Kefirin Titrasyon Asitliği.....	38
3.2.8.2.3. Yoğurdun Titrasyon Asitliği	38
3.2.9. Verilerin Düzenlenmesi ve İstatistik Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. <i>C. difficile</i> Suşunun Kültürü, Doğrulanması ve Kültür için Uygun Besiyerinin	40
4.1.1. Farklı Kültür Ortamlarında <i>C. difficile</i> Koloni Görünümü.....	40
4.1.2. Mikroorganizmaya İlişkin Doğrulama Sonuçları	41
4.1.2.1. Gram Boyama ve Sporlu Formların Boyanması.....	41
4.1.2.2. Hızlı Test Kiti Sonuçları	42
4.1.2.3. Mikroorganizmanın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Sekans Analizi ile Onaylanması.....	42
4.2. Spor Yapılarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi, Spor Stok Süspansiyonu Sayım Sonuçları	43
4.3. Kullanılan Sütün Mikrobiyolojik ve Fiziko-kimyasal Özellikleri.....	44
4.4. <i>C. difficile</i> Sporlarının Çimlenme Etkinliğinin Belirlenmesi	45
4.5. Nisin İçeren Pastörize Sütte <i>C. difficile</i> 'nin Çimlenme Etkinliği.....	48
4.6. Pastörize Sütün Depolanması Esnasında <i>C. difficile</i> Sporlarının Canlılığı, Davranışı ve Nisin Etkisi	49
4.7. Kefirde Etkenin İzlenmesi	53
4.7.1. Kefirde <i>C. difficile</i> Sporlarının Canlılığı	53
4.7.2. Kefir Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	54
4.7.3. pH ve Titrasyon Asitliği Sonuçları	56
4.8. Yoğurda Etkenin İzlenmesi	58
4.8.1. Yoğurda <i>C. difficile</i> Sporlarının Canlılığı ve Davranışı.....	58
4.8.2. Yoğurdun Mikrobiyolojik Analizleri.....	59
4.8.3. Yoğurtlarda pH ve Titrasyon Asitliği Değişimi	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	74
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	85
8. TEŞEKKÜR	87
9. ÖZGEÇMİŞ	88

TÜRKÇE ÖZET

Çoklu ilaç direncine sahip olan ve nozokomiyal bir patojen olarak bilinen *Clostridioides difficile* tedavisi zor enfeksiyonlara yol açmaktadır. Son yıllarda toplum ilişkili vakalardaki artış, etkenin zoonoz özelliğine ve gıdalar yolu ile bulaşma şekline dikkatleri çekmiştir. Çalışmamızda klasik kültürel yöntemleri kullanarak etkenin sporlarının pastörize inek sütünde, yoğurta ve kefirde canlılığı ve davranışı depolama süresince izlenmiştir. İnoküle edilen sporların süt ürünlerinden geri kazanımında kayıpların yüksek olduğu ve etkenin % 90'dan fazlasının kullanılan besiyerinde yeniden çimlendirilemediği saptanmıştır. Sporların uygulanan pastörizasyon işlemlerinden etkilenmediği, ayrıca depolama süresi boyunca pastörize süt, yoğurt ve kefir örneklerinde anlamlı bir yıkımlanmaya maruz kalmaksızın canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir.

Bazı gram pozitif bakteriler ile sporlar üzerine inhibe etkisi olduğu bilinen bir bakteriyosin olan nisin etkisini belirlemek amacıyla, farklı dozlardaki (7,5-12,5-25-50 ppm) Nisin A pastörizasyon sonrası süte ilave edilmiş ve depolama süresince sporlar üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı Nisin A inokülasyon düzeylerinde etkenin tamamen yıkımlanamadığı, en yüksek yıkımlanmanın 25 ve 50 ppm nisin eklenen grupta sırasıyla 1,80 log ve 1,83 log olarak gerçekleştiği saptanmıştır. 50 ppm uygulanan gruptaki yıkımlanma ilk analiz gününde kontrol grubuna göre yaklaşık 1 log seviyesinde ölçülmüştür.

Sonuç olarak, etkenin sporlarının süt ürünlerinden geri kazanımının düşük olduğunu, buna neden olan koşulların incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca ısıya ve depolama koşullarına dirençli olan sporların, gıdalar vasıtasıyla insanlara bulaşmada önemli ve etkin rol oynayabileceğini işaret etmektedir. Diğer sporlu basillus ve klostridialardan farklı olarak üzerinde nispeten daha az çalışma ve bilgi bulunan *C. difficile* hakkında kapsamlı ve multidisipliner çalışmaların yapılması halk sağlığı açısından bir gereklilik olarak görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *C. difficile*, kefir, nisin, pastörize süt, yoğurt

İNGİLİZCE ÖZET

Behavior of *Clostridioides difficile* in Pasteurized Milk, Yoghurt and Kefir and Influence of Nisin

Clostridioides difficile, which has multidrug resistance and is known as a nosocomial pathogen, causes infections that are difficult to treat. The increase in community-related cases in recent years has drawn attention to the zoonotic nature of the pathogen and its food-related transmission properties. In the present study, the viability and behaviour of the spores were monitored in pasteurized cow's milk, yoghurt and kefir during the storage period using classical cultural methods. It is important to notice that losses in the recovery of inoculated spores from dairy products were more than 90% thus, the spores could not be re-germinated in the medium used. The spores were resistant to employed pasteurization processes and their viability was not affected during the storage period in pasteurized milk, yoghurt and kefir samples.

To determine the effect of nisin, a bacteriocin known to have a detrimental effect on some gram-positive bacteria and spores, the milk was first inoculated with spores then pasteurized and Nisin A added at different doses (7.5-12.5-25-50 ppm). The spores could not be destroyed at the tested concentrations. On the first analysis day, approximately 1 log decrease was measured with 50 ppm. The highest destruction was 1.80 log and 1.83 log in the groups where 25 and 50 ppm nisin were added, respectively.

The results obtained from our thesis study reveal that the recovery rate of spores from dairy products is too low and the conditions leading to this recovery loss should be scrutinized. It is also provided evidence that spores that are resistant to heat and storage, may have an important and effective role in the transmission of pathogen to humans through food. From the public health point of view, comprehensive and multidisciplinary studies are necessary to better understand the role of foodstuffs in the contamination route and pathogenicity of *C. difficile* since the actual knowledge acquired is relatively few compared to other spore-forming bacilli and clostridia.

Key words: *C. difficile*, kefir, nisin, pasteurized milk, yoghurt

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ

					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Doktora olarak sunduğum “**Clostridioides difficile'nin Pastörize Süt, Yoğurt Ve Kefirdeki Davranışı Ve Nisinin Etkisi**” başlıklı tez **3-1.120.1133** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Clostridioides difficile, ilk olarak 1935 yılında tanımlanmış psödomembranöz kolitin (PMK) majör etkeni olarak bilinen nozokomiyal bir patojendir. Etken Gram pozitif, sporlu zorunlu anaerob bir basildir. Hipervirulent suşların ve toplum ilişkili ishal ile ilişkilendirilen suşların ortaya çıkması akabinde bu suşların çiftlik hayvanlarından ve gıdalardan izole edilmesiyle etken önem kazanmıştır. Bu gelişmeler aynı zamanda etkenin zoonoz ve/veya gıda kaynaklı bir patojen olup olmadığı yönünde spekülasyonlara yol açmıştır.

Etkenin epidemiyolojisinde sporları ve toksinleri önemli bir yere sahiptir. Bulaşma sporları aracılığıyla, hastalık oluşturması ise toksinleri sebebiyle olmakta fakat her iki hususta da henüz netliğe kavuşmamış birçok nokta bulunmaktadır. Sporlarının gıda ortamlarındaki davranışı ve canlılığı ile ilgili literatür çok sınırlıdır. Spor stabilitesine dair deneysel çalışmaların gıdalar üzerinde yapılmamış olması bir eksiklik olarak görülmektedir.

Çoklu antibiyotik direncine sahip etkenle mücadelede tedaviden çok kolonizasyonu engellemek için probiyotik kullanımı gibi kontrol stratejileri üzerinde durulmaktadır. Alternatif olarak ortamda bulunan spor formların vejetatif hale geçmelerini tetikleyerek inhibe edilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

Henüz gıda kaynaklı bir hastalığa neden olduğuna dair veri bulunmaması sebebiyle, gıda kaynaklı bir patojen olarak kabul edilmeyen etkenin izolasyon ve identifikasyonu zor ve zahmetlidir. Bu amaçla sodyum taurokolat ile sikloserin-sefoksitin veya moksalaktam-norfloksasin içeren selektif besiyerleri geliştirilmiştir. Bazı ticari firmalar ise kromojenik besiyerleri geliştirmiş fakat bunların diferansiyel özellikleri istenilen düzeyde olmamıştır.

İzole edildiği gıdalar arasında çeşitli hayvanlara ait et ve et ürünleri öne çıkmakla beraber, sebzelerden, su ürünlerinden, baldan, süttten de izolasyon yapılmıştır. Etkenin gıdalardaki prevalansı genel olarak düşük görülmektedir. Bunun örnekleme ve izolasyon yöntemi veya gıdaya uygulanan proseslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple etkenin hala gıda kaynaklı bir patojen olabileceği konusu önemini korumaktadır.

Süt sağım aşamasında yeterli hijyenik tedbirler sağlanamadığında toprak ve fekal kaynaklı bulaşmaların olabileceği hayvansal bir gıdadır. Birçok patojen mikroorganizma süte uygulanan ısıl işlemlerle elimine edilebilmesine rağmen, özellikle *Clostridium* ve *Bacillus* cinsi sporlu bakteriler elimine edilememektedir. Bu durum, sütlerden üretilen ürünlerde gıda güvenliği tehlikesi ve kalite problemlerine sebep olmaktadır. Literatürde *Clostridium* cinsi altında sınıflandırılan *C. difficile*'nin çiftlik hayvanlarının dışkılarında varlığı tespit edilmiş olup süt ve süt ürünlerindeki bulunma durumu, davranışı ve çeşitli gıda işleme proseslerinin etkisi konularında ise pek fazla bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada deneysel olarak *C. difficile* sporları inoküle edilen süttten üretilen pastörize süt, yoğurt ve kefirde, klasik kültürel metotlarla etkenin davranışının ve canlılığının belirlenmesi; etkenin bir bakteriyosin olan ve GRAS (Generally Recognized as Safe) bir gıda koruyucusu olarak kabul edilen nisin kullanılarak pastörize sütte inhibe edilmesi amaçlanmaktadır. Temelde *C. difficile* enfeksiyonlarında süt ve süt ürünlerinin rolünün (patogenez/bulaş yolları) anlaşılması, hastalıktan korunma stratejileri geliştirilmesi ve kültürel metotlarla hızlı ve ucuz teşhisi için bilgi oluşturulması hedeflenmiştir.

Çalışma ile süt ve süt ürünlerinin *C. difficile* bulaşmasındaki rolü hakkında fikir sahibi olunarak, elde edilen bilgiler çerçevesinde enfeksiyondan korunma ve yeni korunma stratejileri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Genel amaçlı besiyerine diferansiyel özellik kazandırılarak pahalı ve zahmetli olan *C. difficile* kültürizasyon sürecinin daha ucuz ve pratik bir hale getirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, ısıl işleme alternatif metodlarla sağlıklı ve güvenilir gıda üretimi ve özellikle geriatric hastaların beslenmesi için fonksiyonel gıda üretimi alanlarında güvenilirlik amaçlanmıştır.

Literatür verilerinde *C. difficile*'nin gıdalar vasıtasıyla insanlarda enfeksiyona sebebiyet verdiğine ilişkin çalışma ve veri bulunmamakla birlikte bunun mümkün olabileceği ortaya konulmuştur. Bu açıdan değerlendirildiğinde *C. difficile*'nin gıdalardaki davranışı ve çeşitli gıda işleme proseslerinin etkisi konusunda yapılan çalışmaların yeterli olmadığı görölmektedir. Bu nedenle, *C. difficile* enfeksiyonlarında gıdaların rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için bahsedilen konularda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)

2.1.1. Tarihçe

Clostridioides difficile, ilk olarak Hall ve O'Toole tarafından 1935 yılında anne sütü ile beslenen sağlıklı infantların fekal florasından tanımlanmış ve *Bacillus difficilis* olarak adlandırılmıştır. 1938 yılında *Clostridium* cinsi içinde sınıflandırılmış ve Approved List of Bacterial Names tarafından "*C. difficile*" terminolojisi benimsenmiştir (Rodriguez, Van Broeck, Taminiau, Delmée, & Daube, 2016). Dizi analiz teknolojilerinin katkısıyla *C. difficile*'nin *Peptostreptococcaceae* ailesi ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiş ve adının *Peptoclostridium difficile* olarak adlandırılması önerilmiştir fakat bu kullanım yaygınlaşmamıştır. Son olarak 16S rDNA gen sekans analizi ile *C. difficile* ile *C. mangenotii*'nin % 94.7 benzerlik gösterdiği, filogenetik olarak *C. butyricum* ve diğer *Clostridium sensu stricto*'dan uzak olduğu gösterilmiştir. Fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizlere dayanarak *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile* gen. nov. comb. nov. genusuna transfer edilerek *Clostridioides difficile* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Lawson, Citron, Tyrrell, & Finegold, 2016).

Clostridioides difficile'nin, 1970'lerde sitopatik toksini ve sitopatik etkisi raporlanana kadar normal fekal floranın bir parçası olduğu düşünülmüştür (Rodriguez ve ark., 2016). 1978 yılında ise *C. difficile* antibiyotik ilişkili ishal ve kolitin sebebi olarak tanımlanmıştır (Curry, 2010; Gerding, 2009; Larson, Price, Honour, & Borriello, 1978). Hamster modelinde klindamisin verilen veya klindamisin olmadan sadece *C. difficile* verilen hamsterlarda hastalığın oluşmadığı gösterilerek hastalık oluşumu için iki bağımsız olay olan antibiyotik uygulaması ve *C. difficile* varlığının birlikteliği öne sürülmüştür (Larson, Price, & Borriello, 1980). 1988 yılına gelindiğinde bu bakteri ve ilgili bağırsak enfeksiyonuna dair önemli bilgilerin çoğunun bilindiği; potansiyel olarak hayatı tehdit eden enfeksiyonun tanı ve tedavi yöntemleri ile büyük ölçüde kontrol altına alındığı düşünülmüştür (Gerding, 2009). 2000'li yılların başında Avrupa ve Kuzey Amerika'da, hipervirulent suşlara bağlı olarak, *C. difficile* enfeksiyonlarının (CDI) prevalans,

şiddet ve ölüm oranlarında bir artış raporlanmasıyla ilgili birçok çalışma yapılmış, *C. difficile*' in zoonoz ve/veya gıda kaynaklı bir enfeksiyöz ajan olup olmadığı tartışma konusu olmuştur (Indra ve ark., 2009; Marsh, 2013).

2.1.2. Özellikleri

Clostridioides difficile Gram-pozitif, sporlu, zorunlu anaerob, çubuk şekilli, genellikle hareketli bir bakteridir. Hücre boyutu $0,5-1,9 \times 3,0-16,9$ µm arasında değişmektedir. Bazı suşlar iki ile altı hücreden oluşan zincirler oluşturur. Sporları oval, subterminal (nadiren terminal) yerleşimlidir (Lawson ve ark., 2016).

Karbonhidrat kaynağı olarak fruktoz ve glikozu kullanabilirken amigdalin, arabinoz, galaktoz, glikojen, inositol, inulin, laktoz, maltoz, melezitose, raffinise, rhamnose, riboz, nişasta ve sü krozu kullanamazlar. Selobiyoz, salizin, sorbitol, trehaloz ve ksiloz kullanımları zayıftır. Urasil kullanamazlar. Büyüme için; prolin, aspartik asit, serin, leusin, alanin, treonin, valin, fenilalanin, metiyonin kullanırlar ve δ-amino-valerat ve α-aminobutirat üretirler (Lawson ve ark., 2016).

Pepton Yeast Glucose (PYG) sıvı besiyerinde bol miktarda H₂ ile amonyak üretirler. Bunun dışında asetik, izobütirik, bütirik, izovalerik, valerik, izokaproik, formik ve laktik asit üretirler. H₂S üretimi suşa göre değişmektedir. Pirüvatı asetat ve bütirata; treonini propiyonata dönüştürürler. Laktatı kullanamazlar. Lösinden izokaproat; lösün ve izolösinden izovalerat; valinden ise izobütirat üretilirler (Lawson ve ark., 2016).

Referans tip suş safra asitleri olan kolik asit, kenodeoksikolik asitleri metabolize eder ve taurokolik asit konjugatını parçalar. Hücre duvarları meso-DAP içerir. Bazı suşlarda hyaluronidaz, hücre dışı β-glukuronidaz, kondroitin sülfataz ve kollejenaz enzimleri bulunabilir (Lawson ve ark., 2016).

2.1.3. Kültür ve Koloni Morfolojisi

Clostridioides difficile suşları 25–45 °C arasında çoğalabilmekte olup optimum çoğalma sıcaklığı 30–37 °C 'dir. Koloni morfolojisi; kanlı agarda nonhemolitik, 2–5 mm boyutunda dairesel, çoğunlukla rhizoid, düz veya hafif konveks, opak, grim-

beyazımsı mat cam görünümündedir (Curry, 2010). Daha hareketli *C. difficile* suşlarının koloni genişlikleri 12 ila 15 mm'dir ve genellikle "at gübresi" veya "ahır" kokusu olarak adlandırılan karakteristik bir koku sergilerler (Curry, 2010).

At kanı ve K vitamin eklenmiş Brusella Kanlı Agar'da 48 saat inkubasyon sonrasında tüm suşlar, uzun dalga ultraviole ışıkta geçici birkaç saat içinde kaybolan soluk yeşil floresans oluşturur. Pepton Yeast Glucose (PYG) sıvı besiyerinde dipte pürüzsüz bir çökelti ile bulanık görünürler. Bu besi ortamında 5 günlük inkubasyon sonrasında pH 5.5 –5.7 seviyelerine düşer (Lawson ve ark., 2016).

Küçük *C. difficile* kolonilerinin morfolojik olarak diğer hemolitik olmayan *Clostridium* spp. kolonilerinden ayırt edilmesi zor olabilir, ancak L-prolin aminopeptidaz spot disk aktivitesi ile hızlı biyokimyasal doğrulama şüpheli *C. difficile*'nin doğrulanmasını sağlayabilir (Curry, 2010).

Selektif besiyeri olarak genellikle sefoksitin, sikloserin ve nötral kırmızı içeren pepton bazlı sıvı ve katı besiyerleri 48 saat inkube edilerek kullanılmaktadır. Bir safra tuzu olan sodyum taurokolat ise *C. difficile* sporlarının jermantasyonu için selektif besiyerlerinin esansiyel bir bileşenidir (Curry, 2010). Çalışmalar ham taurokolat veya saf taurokolat içeren Cycloserine-sefoxitin Fruktose Agar (CCFA) besiyerinin önemli ölçüde geri kazanım sağladığını göstermiştir (Buggy, Hawkins, & Fekety, 1985). Spor germinasyonunu ve gelişimini uyarıcı at kanlı, sodyum taurokolat içeren BHI bazlı besiyerleri sayım amacıyla kullanılan geri kazanım besi ortamlarıdır (Cox, McDonald, & St Onge, 2018).

Clostridioides difficile'nin gıdalardan izolasyonunda % 6 at kanlı moksalaktam-norfloksasin ilave edilmiş Fastidious Anaerobe Agar (CDMN), sodyum taurokolat içeren Cycloserine-Sefoksitin Fruktose Agar (CCFA), Columbia Kanlı Agar kullanılmaktadır. Kantitatif analizlerde ise BHI agar bazlı besiyerleri kullanılmaktadır (Lawley ve ark., 2009).

Hızlı izolasyon amacıyla geliştirilen bazı ticari mavi renkli kromojenik besiyerlerinde ise 24 saat inkubasyon sonrasında genellikle renksiz veya gri-siyah koloniler oluşmaktadır. Fakat bu besiyerleri *C. difficile* olmayan klostridiaların büyümesine de izin verirler (Curry, 2010).

Tiyoglikolik asit (merkaptasetik asit), L-sistein, sikloserin-sefoksitin ve nötral kırmızı içeren brusella sıvı besiyerinin (CDBB-TC) selektifliğinin *C. sporogenes*

(ATCC 11437), *C. perfringens* (ATCC 131124) ve *B. subtilis* (ATCC 6051) sporları ve fakültatif organizma olarak *Enterococcus faecium* (C68), metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (klinik izolat), *S. warneri* (ATCC 14990), ve *Candida glabrata* (ATCC 90030) suşları üzerinden değerlendirilmesi sonucunda; tüm bu suşların aerobik ortamda üremediği ancak *C. sporogenes* ve *C. perfringens* suşlarının anaerobik ortamda ürediği gözlenmiştir (Cadnum ve ark., 2014). Dahası bu besiyerinin hassasiyeti % 88 ve özgüllüğü % 100 olarak bulunmuştur (Cadnum ve ark., 2014). *C. difficile* izolasyonunda kullanılan bazı besiyerlerinin hassaslıkları ve özgüllükleri Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. *C. difficile* izolasyonunda kullanılan bazı besiyerlerinin hassaslık ve özgüllükleri

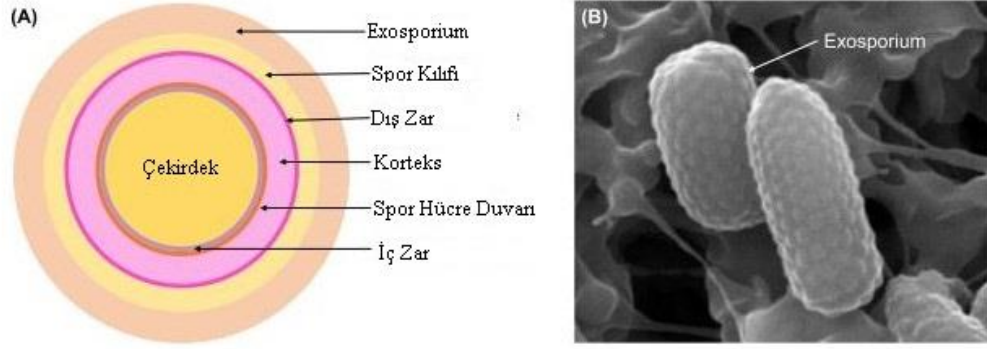
Besiyeri	Numune	Hassaslık	Özgüllük	Referans
Taurokolat CCFA	Dışkı	% 70	% 97	(Roux, Le Guern, Courcol ve Gaillot, 2014)
CHROMagar™ <i>C. difficile</i>	Dışkı	% 95.4	% 88.8	(Roux, Le Guern, Courcol ve Gaillot, 2014)
CHROMID® <i>C. difficile</i>	Dışkı	% 100	% 90.6	(Han ve ark., 2014)
CDSA (BBL)	Dışkı	% 83.3	% 72.5	(Han ve ark., 2014)
CDBB-TC	Çevresel Svap	% 88	% 100	(Cadnum ve ark., 2014)

2.1.4. Spor Biyolojisi ve Yapısı

Artan sayıda çalışma, toksin üreten *C. difficile* izolatlarına ait sporların genellikle hayvanlarda, rekreasyon sularında, çığ ve yemeye hazır yiyeceklerde değişen oranlarda (% 0–66) bulunabileceğini göstermektedir (Gil, Lagos-Moraga, Calderón-Romero, Pizarro-Guajardo, & Paredes-Sabja, 2017).

Clostridioides difficile'nin zorunlu anaerob doğasından dolayı bulaşmasında aerotolerant sporları önemli bir yere sahiptir (Gil ve ark., 2017). *C. difficile*'nin sporlanması ana düzenleyici *Spo0A* geninin kontrolü altındadır ve ortamda besinlerin tükenmesi ve ortak algılama (quorum sensing) mekanizması ile tetiklendiği yönünde düşünceler ağırlık kazanmaktadır (Lawler, Lambert, & Worthington, 2020).

Sporlu yapı vejetatif hücre ile ilişkili olmayan, bakterinin direncine ve dayanıklılığına katkıda bulunan özelliklere ve bileşenlere sahiptir (Lawler ve ark., 2020). Sporum merkezinde, çimlenme sırasında metabolik aktiviteye dönüş için gerekli olan DNA, tRNA, ribozomlar ve enzimleri içeren dehidre spor çekirdeği bulunur. Suyu alınmış spor çekirdeğinin ağırlığı cinse, türe bağlı olarak yaş ağırlığının sadece % 25-55'i kadardır. Düşük su içeriği, sporlu formdaki enzimatik uyku hali sağlanması ve ısıya karşı direncin şekillenmesinde birincil faktördür. Çekirdek, iki değerlikli Ca^{2+} katyonu ile dipikolinik asidin (DPA) şelat oluşturacak şekilde 1:1 oranında birleşmesiyle doyurulur. Ca-DPA çekirdekteki su içeriğinin azalmasına katkıda bulunur (Lawler ve ark., 2020). Spor çekirdeğindeki DNA, yalnızca spor çekirdeğinde bulunan ve asidik ortamda çözünür haldeki SASP proteinlerine bağlıdır. Bu proteinler DNA'yı koruyucu olarak görev yaparlar ve kurutma, ısı, kimyasallar ile UV gibi faktörlere karşı sporum direncinden sorumludurlar (Lawler ve ark., 2020). Çekirdek, DNA'ya zarar veren bileşiklerin girişini önleyerek spor direncine katkıda bulunan bir iç zar ile çevrilidir. Bu iç zar bakterinin çimlenmesi esnasında hücrenin duvarı haline gelen bir peptidoglikan tabakası ile çevrilidir. Bu tabakanın devamında geniş bir korteks tabakası vardır. Bu tabaka, çimlenme sırasında korteks litik enzimleri tarafından hidrolize edilen, spora özgü modifiye çapraz bağlı peptidoglikanlardan oluşur. Korteks, spor direncinde rolü olmayan bir dış zar ile çevrilidir. Dış zarın çevresinde ise bir geçirgenlik bariyeri olarak görev yapan ve hücreyi enzimatik, kimyasal ve biyosit saldırılara karşı koruyan bir spor kılıfı bulunur. Spor kılıfı en dışta çok katmanlı bir protein yapısında olan ekzosporium ile kaplıdır. Exosporium tabakası *C. difficile* suşları arasında morfolojik olarak değişkenlik gösterir ve spor direncine katkıda sağladığına inanılmaktadır. *C. difficile* ekzosporium tabakasında sisteinden zengin (CdeC) proteini içermeyen sporların lizozim, etanol ve ısı işleme karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Lawler ve ark., 2020). Spora ait katmanların şematize edilmiş hali ve sporum ekzosporium tabakasını gösteren elektron mikroskopi resmi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. *Clostridioides difficile* spore yapısı. Spora ait katmanların şematize edilmiş hali (A). *C. difficile* NCTC 11204 spor yüzeyinde ekzosporium tabakasını gösteren elektron mikroskopi resmi (B) (Lawler ve ark., 2020).

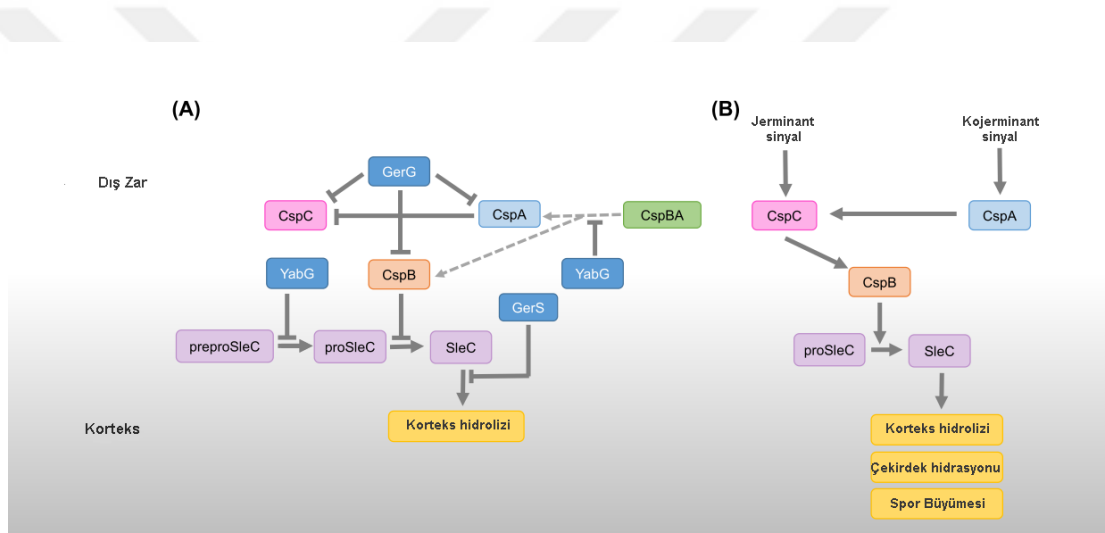
Clostridioides difficile spor yapısı, *Bacillus* ve *Costridium* türlerinin spor yapılarına benzemekle beraber bazı değişiklikler gösterir. *C. difficile* sporlarının en dış katmanı, *B. cereus* grubunun üyeleri gibi bir ekzosporium katmanına ve saç benzeri çıkıntılara sahiptir ancak ekzosporium katmanını, spor kılıfından ayıran ara boşluktan yoksundur. Bu açıdan en dıştaki katman *B. subtilis* sporlarının en dıştaki kabuk tabakasına benzer bir şekilde spor kılıfıyla doğrudan temas halindedir (Gil ve ark., 2017). Bu yapısal benzerliğe rağmen, *B. subtilis* ve / veya *B. cereus* grubu için tanımlanan spor kılıf proteinlerini kodlayan genlerin yalnızca % 25'inin *C. difficile*'de homologları vardır (Paredes-Sabja, Shen, & Sorg, 2014).

2.1.4.1. Sporların Dayanıklılığı

Clostridioides difficile sporları yüksek sıcaklık, çok kuru ya da nemli ortamlar ile farklı kimyasalların etkileri gibi değişik zorlu koşullara dayanıklıdır ve bu ortamlarda canlılıklarını sürdürebilirler (Bauer & Kuijper, 2015). *C. difficile* endosporları ısıya, % 70 etanole ve amonyak bazlı deterjanlarına direnç gösterdiği ancak sodyum hipoklorit bazlı solüsyonlarla inaktive edilebildikleri gösterilmiştir (Curry, 2010). Isı direnci çalışmalarında *C. difficile* sporlarının gıda ve hazır yemek endüstrilerinde kullanılan pastörizasyon rejimlerine dayanıklı olduğunu göstermiştir (Gil ve ark., 2017).

2.1.4.2. Spor Çimlenmesi

Hayatta kalma stratejisinin bir parçası olarak sporlu bakteriler, çimlenme için uygun şartlar sağlandığında değişen çevresel koşulları algılayarak vejetatif forma geçerler (Şekil 2). *C. difficile*'de spor çimlenmesinde, psödoproteaz olarak görev yapan CspC ve CspA enzimleri tarafından ortamdaki germinant (safra tuzları) ve kogerminantların (amino asit) varlığı algılanır. Bu çimlenme sinyali ile CspC serin proteaz olan CspB'ye dönüştürülür. CspB korteksin hidrolizine yol açan litik enzim SleC'yi aktive eder. Böylece spor korteksindeki peptidoglikan parçalanır (Lawler ve ark., 2020).



Şekil 2. *C. difficile* çimlenmesinin düzenlenmesi. Ana düzenleyicilerin rolü (A). Çimlenmedeki basamaklar (B). (Lawler ve ark., 2020).

Clostridioides difficile sporlarının çimlenmesinde safra tuzları (taurokolat ve/veya kolat) ve L-glisin sinyal başlatıcı olarak görev yapar (Gil ve ark., 2017; Lawler ve ark., 2020). Bu açıdan *C. difficile* benzersizdir. Çünkü safra tuzları ve L-glisin varlığında filizlenen tek türdür (Gil ve ark., 2017).

Bunun yanında *C. difficile* sporları in-vitro olarak KCl, inorganik fosfat (P_i), dodesilamin ayrıca Ca^{2+} ve dipkolonik asit şelatı (DPA) ile çimlenebilir (Paredes-Sabja, Bond, Carman, Setlow, & Sarker, 2008). Gastrointestinal sistemde spor çimlenmesinde KCl ve inorganik fosfat (P_i), rol aldığı da düşünülmektedir çünkü her iki molekül sindirim sisteminde yeterince bulunmaktadır (Paredes-Sabja ve ark., 2008).

Etkenin çimlenmesi ortamın pH ve sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Wheeldon, Worthington, Hilton, Elliott, & Lambert, 2008). Çimlenme için optimum pH aralığı 6,5-7,5 ‘tir ve asidik koşullarda (pH 5,5-6) çimlenme oranı ve derecesi nötral veya alkalın koşullara kıyasla önemli ölçüde azalmaktadır (Wheeldon ve ark., 2008). Bununla birlikte 60 dakika boyunca çimlenmeyi tetikleyici germinanta maruziyet sonrası 20 °C ve 37 °C’de çimlenme seviyesinde önemli bir fark bulunmamıştır (Wheeldon ve ark., 2008). Ayrıca çalışmalar sayım öncesi yapılan ısı aktivasyonunun, çimlenen spor titresini artıran bir uygulama olduğunu göstermiştir (Moore, Kyne, Martin, & Solomon, 2013; Paredes-Sabja ve ark., 2008).

Toplum ilişkili *C. difficile* enfeksiyonları (CDI) vakalarıyla ilişkilendirilen Ribotip027, Ribotip106 ve Ribotip 078’in % 0.1 (w/v) sodyum taurokolat varlığında çimlenme etkinliği sırayla % 51,66, % 41,91 ve % 42,07 olarak belirlenmiştir (Moore ve ark., 2013). Şiddetli CDI vakalarından izole edilen suşların spor germinasyon etkinliğinin şiddetli olmayan vakalardan izole edilen suşlara göre önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Moore ve ark., 2013). Tekrarlayan CDI vakalarında veya başarısız metronidazol tedavisi durumlarında, tedavinin başarılı olduğu duruma göre spor çimlenme etkinliği önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Moore ve ark., 2013).

2.1.4.3. Spor İnhibisyonu

İnhibisyon çalışmalarında safra tuzları (Sorg & Sonenshein, 2010; Thanissery, Winston, & Theriot, 2017), antibiyotikler, (Garneau, Valiquette, & Fortier, 2014; Srisuwan ve ark., 2018), bakteriyosinler (Chai, Lee, & Oh, 2015; Hanchi ve ark., 2017; Hofstetter, Gebhardt, Ho, Gänzle, & McMullen, 2013; Le Lay, Dridi, Bergeron, Ouellette, & Fliss, 2016; Nerandzic & Donskey, 2013) ve probiyotik bakterilerin supernatantları (Schoster ve ark., 2013; Trejo, Minnaard, Perez, & De Antoni, 2006) çalışılmıştır. Sodyum nitrit, sodyum nitrat, sodyum metabisülfid (Lim, Foster, & Riley, 2016), lizozim (Chai ve ark., 2015), laurik asit (Yang ve ark., 2018) ve equol (Tanaka, Kimura, Ishii, & Tateda, 2019) çalışılan diğer bileşiklerdir.

Daha önce belirtildiği gibi *C. difficile* sporları çimlenme için spesifik safra asit ve amino asitlere ihtiyaç duyarlar. Primer safra asitleri (taurokolat ve kolat) glisin ile birlikte *C. difficile* için birincil germinantlardır (Thanissery ve ark., 2017). İkincil safra tuzları (SBA) ise kolonizasyon direnci ile ilişkilidir ve *C. difficile*'nin çimlenmesini ve büyümesini inhibe eder (Lawler ve ark., 2020; Sorg & Sonenshein, 2008). Primer safra asidi olan kenodeoksikolat, taurokolat aracılı çimlenmeyi rekabetçi bir şekilde inhibe eder. Çünkü *C. difficile* kenodeoksikolat için daha yüksek bir affiniteye sahiptir. Böylece taurokolat konsantrasyonu kenodeoksikolatın inhibe edici etkisinin üstesinden gelene kadar çimlenme baskılanır (Lawler ve ark., 2020). Benzer şekilde ω -murikolat (ω MCA), lithokolat (LCA), ursodeoksikolat (UDCA) ve hiyodeoksikolat (HDCA) taurokolat (TCA) ilişkili spor germinasyonunu inhibe eder (Thanissery ve ark., 2017).

Nisinin *C. difficile* üzerine olan inhibitör etkisi uzun zamandır bilinmektedir (Bartoloni ve ark., 2004). Düşük dozda nisinin tek başına çimlenmeyi uyarmadığı veya sporları öldürmediği ancak çimlenmekte olan sporların nisine duyarlı olduğu bildirilmiştir (Nerandzic & Donskey, 2013). Daha sonraki çalışmalarda ise yüksek dozlarda nisinin çimlenmeyi azalttığı ve hatta spor canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Chai ve ark., 2015; Le Lay ve ark., 2016).

Clostridioides difficile inhibisyonuna yönelik çalışmalarda 10 ticari probiyotik suşundan elde edilen supernatantların *C. difficile*'yi in vitro olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Schoster ve ark., 2013). Bu suşlar *Lactobacillus plantarum* (BG112, LBc, LPAL, LBd), *L. rhamnosus* (LRH19, LRB, SP1), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BLC1), *L. casei* (LC11) ve *L. salivarius* (LBb) suşlarıdır (Schoster ve ark., 2013).

2.1.5. Toksin Varlığı

Kolon epiteli için öldürücü toksin üretim yeteneği *C. difficile* patojenezinin ayırt edici bir özelliğidir (Galdys, Curry, & Harrison, 2014). *C. difficile* iki büyük protein toksin üretir, bunlar toksin A (TcdA) ve toksin B (TcdB)'dir. Bu toksinler 19.6-kb patojenite lokusunda (PaLoc) yerleşmiştir ve PaLoc içeren *C. difficile* suşları toksijeniktir (Galdys ve ark., 2014; Gerding, Johnson, Rupnik, & Aktories, 2014)

TcdA ve TcdB, Rho ailesi GTPazları inaktive ederek aktin hücre iskeletinin düzensizleşmesine ve sonrasında hücre ölümüne sebep olur (Hutton, Mackin, Chakravorty, & Lyras, 2014). TcdA, kalın bağırsakta sıvı birikimine neden olduğundan enterotoksin olarak; TcdB sitopatik etkisinden dolayı sitotoksin olarak da adlandırılır. Hamsterlara oral olarak toksin B verilmesi ölümcül değilken toksin A verilmesi ölümcüldür. Fareler için her iki toksin de ölümcüldür (Lawson ve ark., 2016). Klinik çalışmalar, semptomatik hastaların hem TcdA hem de TcdB üreten *C. difficile* suşları ile enfekte olduğunu doğrulamıştır (Gerding ve ark., 2014).

Bir diğer toksin olan binary (ikili) toksin, aktini modifiye eden enzimatik ADP-riboziltransferaz aktivitesine sahip CDTa ve konak hücrelere bağlanan ve CDTa'yı sitozole çeviren CDTb adlı iki ayrı toksinden oluşur (Gerding ve ark., 2014). CDT, PaLoc dışında bulunur ve 6,2-kb CdtLoc olarak adlandırılan lokusta kodlanır (Gerding ve ark., 2014). Farklı ribotipler, PFGE tipleri ve REA tiplerinin az bir kısmında binary toksin bulunur ancak çoğu non-toksinotip-0 varyantta bulunur (Gerding ve ark., 2014). Binary toksin üreten suşların prevalansının insanlara göre hayvanlarda daha yüksek olduğu (Özgen, & Yıldırım, 2018) ve hayvan modellerinde nispeten daha hafif seyreden hastalığa sebep olduğu rapor edilmiştir (Galdys ve ark., 2014). Ancak insanlarda 2000'li yılların başından itibaren giderek daha yaygın hale geldiği görülmüştür (Gerding ve ark., 2014).

2.1.6. Antibiyotik Direnci

Çoklu ilaç direncine (MDR) sahip *C. difficile* enfeksiyonları maliyetli bir tedaviye, hastanın izolasyonuna ve uzun süreli yatışlara yol açmaktadır. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2013 yılında antibiyotik direnci tehditleri ile ilgili yayınladığı raporda *C. difficile* enfeksiyonlarını “acil ve kapsamlı bir müdahale gerektiren kamu sağlığı tehdidi” anlamına gelen “acil tehdit” olarak sınıflandırmıştır (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2013). Raporun 2019 revizyonu, sevdiklerini antibiyotik direnci veya *C. difficile* nedeniyle kaybedenlere adanmış ve raporda *C. difficile* mevcut “acil tehdit” konumunda devam etmektedir (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2019).

Birçok *C. difficile* suşu 8 U penisilin g/ml; 4 µg ampicillin/ml; 4 µg vancomisin/ml ve 2 µg metronidazole/ml'e duyarlıdır. Klindamisin, rifampin, tetrasiklinler, kloramfenikol ve eritromisin duyarlılığı değişken olmakla birlikte tüm suşlar aminoglikozitlere ve sefamisinlere dirençlidir. Ayrıca tetrasiklin direncinin, dirençli suştan duyarlı suşa transfer edilebildiği gösterilmiştir (Lawson ve ark., 2016). Klindamisin, makrolidler, florokinolonlar ve rifampine karşı antibiyotik direnci özellikle BI/NAP1/027 suşlarında daha yaygındır ve bu tür antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıldığı hastaneler içinde organizmanın yayılmasının güçlenmesine yol açmaktadır (Curry, 2010).

2.1.7. Patojenite ve Epidemiyoloji

Clostridioides difficile esas olarak fekal-oral yolla bulaşmaktadır (Leffler, & Lamont, 2015). Bulaşmada sporlar, hastalık oluşumunda ise toksinler önemli rol oynamaktadır. Etkenin oral bulaşmasını takiben sporlar ince bağırsaklara taşınır, burada safra asitlerinin uyarısıyla çimlenerek vejetatif forma dönüşür, vejetatif hücreler toksin genleri sayesinde toksin üretir (Galdys ve ark., 2014). TcdA ve TcdB toksinleri kolonosit ölümleri, intestinal bariyerde fonksiyon kaybı ve nötrofilik kolitise sebep olur (Leffler & Lamont, 2015). Ayrıca insanlarda antimikrobiyal tedavi sonrası bozulan bağırsak mikrobiyomuna bağlı olarak aşırı çoğalırlar ve pseudomembranöz kolite sebep olurlar (Lawson ve ark., 2016).

Antibiyotik kullanımı, ilerlemiş yaş, gastrointestinal operasyonlar, immunsupresyon, antineoplastik kemoterapi gibi kolon mikrobiyomunu bozan durumlar hastalığın ortaya çıkmasında risk faktörüdür (Leffler, & Lamont, 2015). Öte yandan geniş çaplı bir araştırma prospektif olarak *C. difficile* kolonize tanısı alan bireylerin yalnızca % 2,1' inde hastalığın geliştiğini; çoğu bireyin toksijenik *C. difficile* kolonizasyonunu hastalanmadan tolere ettiğini göstermiştir (Galdys ve ark., 2014). İnsanlar *C. difficile*'i sürekli asemptomatik bir şekilde taşıyabildikleri gibi kısa süreli asemptomatik veya semptomatik olarak taşıyabilirler. Etkeni sürekli asemptomatik taşıyan bireylere taşıyıcı; diğer durumlardaki bireylere kolonize birey denilir. Çeşitli çalışmalarda hayatının ilk yılındaki bebeklerde taşıyıcılık oranının % 25-35 olduğu ve bu oranın 1-8 yaşları arasında % 15'e düştüğü raporlanmıştır (Smits,

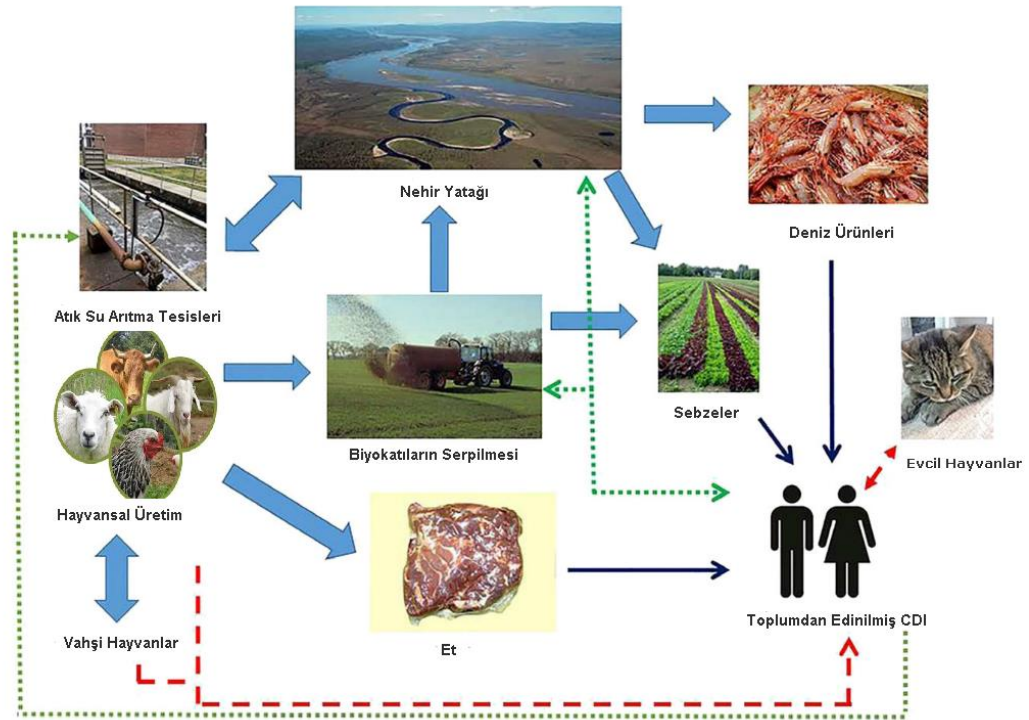
Lyras, Lacy, Wilcox, & Kuijper, 2016). Toplumdaki asemptomatik kolonizasyon (kısa veya uzun süreli) oranı ise % 2-4 arasındadır (Smits ve ark., 2016). Hastanelerde asemptomatik kolonizasyon prevalansı, hastanede kalış süresine, kullanılan antibiyotiklere, altta yatan hastalığa ve muhtemelen asit baskılayıcı ilaç kullanımına bağlı olarak % 7 ila % 18 arasında değişir (Smits ve ark., 2016). Ancak bir salgın sırasında bu kolonizasyon oranı % 50'yi aşabilir (Smits ve ark., 2016). Asemptomatik kolonize ve taşıyıcı bireyler şu anda enfeksiyon önleme uygulamalarının hedefi değildir ancak muhtemelen bu bireyler çevrelerini kontamine ederek diğer insanlara etkenin geçmesine neden olmaktadır (Galdys ve ark., 2014).

Milyen yılların başlarında *C. difficile* infeksiyonlarında çarpıcı bir artış olduğu bildirilmiştir. 1999'dan 2004'e kadar ABD'de *C. difficile*'ye bağlı yıllık ölüm oranı milyon başına 5,7'den 23,7'ye yükselmiştir (Galdys ve ark., 2014). Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'dan izole edilen izolatlar CDC tarafından BI/NAP1/027 olarak bilinen toksinotip III, restriksiyon endonükleaz analiz grup BI, North American pulsed-field gel elektroforezis tip NAP1 ve polimeraz zincir reaksiyon tip 27 olarak karakterize edilmiştir (Leffler, & Lamont, 2015). Bu tip, daha az virulent olan 001 veya 004 ribotiplerine göre 3 kat daha yüksek ölüm oranı ile karakterizedir (Leffler, & Lamont, 2015). 2005'ten itibaren Avrupa'da görülen 078 ribotipi ise daha çok genç erişkinlerde ve toplum ilişkili *C. difficile* infeksiyonlarında tanımlanmıştır (Goorhuis ve ark., 2008). Salman ve arkadaşları hipervirulent şuşların ülkemizde de görüldüğünü fakat ribotip 027'nin varlığının gösterilemediğini bildirmişlerdir (Salman, Levent, & Karahan, 2017). Sonuç olarak hastalığın epidemiyolojisinde toplum kökenli vakalara da rastlanılmaktadır ve antibiyotik tedavisi almamış bireyler ile sağlıklı genç kişilerin de risk altında olduğu kabul edilmektedir (Leffler, & Lamont, 2015).

2.2. Gıdalarda Bulunma Durumu

Toplumla ilişkili *C. difficile* hastalığındaki artış, perakende gıdalardaki *C. difficile* varlığına dair verilerle eşleştirilerek, *C. difficile*' in gıda kaynaklı bir patojen olduğu spekülasyonuna yol açmıştır (Marsh, 2013). Gıda kaynaklı herhangi bir hastalığa neden olduğuna dair doğrulanmış bir vaka olmamasına rağmen çiftlik

hayvanlarında ve gıdalarda görülmesi, sporlarla kontamine olmuş gıda ürünlerinin *C. difficile* enfeksiyonu yayılmasında araç olabileceğini düşündürmektedir (Bauer & Kuijper, 2015; Candel-Pérez, Ros-Berruezo, & Martínez-Graciá, 2019). İyi bilinen gıda patojenleri olan *C. perfringens* ve *C. botulinum* gibi diğer klostridiaların fekal-oral yolla bulaşması, *C. difficile*'in de gıda aracılığıyla bulaşması teorisini destekleyebilecek niteliktedir (Warriner, Xu, Habash, Sultan, & Weese, 2017). *C. difficile*'nin bulaşma zinciri Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3 *C. difficile*'nin bulaşma zinciri (Warriner ve ark., 2017).

2.2.1. Gıda Zincirindeki Olası Kaynak ve Kontaminasyon Yolları

Clostridioides difficile ile ilgili birçok rapor, bu organizmanın tatlı sular, deniz suları ve atık sular dahil olmak üzere su, toprak ve doğal olarak her yerde bulunduğunu göstermektedir (Candel-Pérez ve ark., 2019). Atık suların tarımsal sulamada kullanılması, ruminant dışkılarının tarımda gübre olarak kullanımı, kontamine suların sulama ve gıdaların yıkanmasında kullanımı özellikle sebze ve meyveler için kontaminasyon kaynağı olabilir (Candel-Pérez ve ark., 2019). Kontamine kompostlarda ve dışkılarda etkenin çeşitli şartlarda inhibe olmadan

bulunabildiği çeşitli yayınlarda gösterilmiştir (Dharmasena, 2018a; Dharmasena, Wang, Wei, Bridges, & Jiang, 2021; Usui ve ark., 2017; J S Weese, Staempfli, & Prescott, 2000).

Deniz ürünlerinin, özellikle midyelerin, filtrasyon yoluyla beslenmeleri ve patojenleri konsantre etmeleri sebebiyle *C. difficile* ile kontamine oldukları gösterilmiştir (Candel-Pérez ve ark., 2019).

Mezbahanelerde iç organ çıkarma sırasında bağırsak içeriğinin dökülmesi veya mezbaha ortamındaki spor birikimi karkasların kontaminasyonuna sebep olabilir. Mezbahanelerden yapılan örneklemelerde mezbahane atık suyunda ve karkaslarda etken değişen oranlarda tespit edilmiştir (Abay, Ahmed, Aydin, Karakaya, & Müştak, 2022; Candel-Pérez ve ark., 2019; Hampikyan ve ark., 2018; Keessen ve ark., 2011; Rodriguez ve ark., 2013; J Scott Weese, Rousseau, Deckert, Gow, & Reid-Smith, 2011). Ayrıca asemptomatik veya semptomatik evcil hayvanlar ile insanlar, gıda zincirindeki ve *C. difficile* ile kirlenmiş yüzeylerdeki kontaminasyonun kaynağı olabilirler (Bauer, & Kuijper, 2015; Candel-Pérez ve ark., 2019).

2.2.2. Gıdalardaki Hayatta Kalması ve Çoğalması

C. difficile gıda kaynaklı bir patojen kabul edilmediğinden diğer *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin aksine, gıdalardaki canlılığı ve vejetatif hücre çoğalmasına ilişkin bilgiler sınırlıdır (Candel-Pérez ve ark., 2019). Mevcut çalışmalarda sınırlı sayıda *C. difficile* suşu kullanıldığından spor stabilitesinin sadece küçük bir kesitini yansıtmaktadır (Deng, Plaza-Garrido, Torres, & Paredes-Sabja, 2015; Deng, Talukdar, Sarker, Paredes-Sabja, & Torres, 2017; Flock ve ark., 2015; McSharry, Koolman, Whyte, & Bolton, 2021; Rodriguez-Palacios, Reid-Smith, Staempfli, & Weese, 2010; Sepulveda-Diaz, 2013; Sugeng, 2012; Warriner ve ark., 2017). Bu çalışmalarda spor canlılığının, düşük sıcaklıkta pek değişmediği ancak düşük su aktivitesinden etkilendiği gösterilmiştir (Deng ve ark., 2015, 2017). Ayrıca modifiye atmosfer paketli et ürünlerinden *C. difficile* izolasyonunun yapılarak oksijeni uzaklaştırılmış gıdalarda *C. difficile*' in hayatta kalabildiği gösterilmiştir (Atasoy, & Gücükoğlu, 2017).

Etkenin ısıya dayanıklılığına ilişkin yapılan bir çalışmada *C. difficile* suşlarının et pişirmede tavsiye edilen 71 °C’de 2 saat canlı kalabildiği fakat 85 °C’de tekrar ısıtma uygulanması durumunda % 90’ının öldüğü bildirilmiştir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2010).

2.2.3. Gıdalardaki Yaygınlığı ve Tiplendirme Çalışmaları

Çevrede ve gıdalarda *C. difficile* sayısı düşük olmasına rağmen ısıtma işlemine dirençli sporlu yapısı gıda kaynaklı bulaşmayı kolaylaştırabilir (Bauer, & Kuijper, 2015). *C. difficile*, sıklıkla et ve et ürünlerinden, deniz ürünlerinden, sebzelerden, kanatlı eti ürünlerinden izole edilmektedir ve izole edildiği gıdalardaki prevalansı % 0-62,5 arasında değişmektedir (Ersöz, & Coşansu, 2014; Metcalf ve ark., 2011; Rahimi, Jalali, & Weese, 2014(a); Rahimi, Momtaz, & Hemmati, 2014(b); Scholtzek, Heise, Witt, Hanuschik, & Maurischat, 2022; Songer ve ark., 2009; Sugeng, 2012; Tkalec ve ark., 2019; Von Abercron, Karlsson, Wigh, Wierup, & Krovacek, 2009; Weese, Reid-Smith, Avery, & Rousseau, 2010). Süt ve süt ürünlerinde etkenin varlığının araştırılmasına dair az sayıda çalışma mevcuttur. Avusturya’da yapılan bir çalışmada baktöfugasyon uygulanan çiğ sütlere ait 50 baktöfugattan *C. difficile* izole edemediklerini bildirmişlerdir (Jöbstl ve ark., 2010). Kanada’da yapılan çalışmada yarı yumuşak peynirlerde % 9,6 (14/146) oranında pozitiflik bulunmuş ve bu oranın kıymada bulunan 12,8 oranına yakınlığına dikkat çekilmiştir (Sugeng, 2012). Aynı çalışmada pastörize sütte *C. difficile* pozitiflik oranı % 2 (2/100) olarak; tatlandırılmış sütlerde ve kremada etkenin izole edilemediği bildirilmiştir (Sugeng, 2012). İran’da yapılan çalışmada ise inek sütünde *C. difficile* prevalansının 1,43 (2/135) olduğu ve izolatlardan birinin 078 ribotip olduğu bildirilmiştir (Rahimi ve ark., 2014b).

Gıdalardan ve çiftlik hayvanlarından sıklıkla izole edilen suşların dağılımını incelendiğinde ribotip 017, 027, 078 tipleri öne çıkmaktadır (Ersöz, & Coşansu, 2014). 017, 027, 078 ribotipleri toplum ilişkili *C. difficile* infeksiyonlarında da sıklıkla izole edilmektedir. Avrupa ülkelerinde gıdalardan en çok izole edilen *C. difficile* ribotipleri 001 ve 004’ tür (Candel-Pérez ve ark., 2019).

Ülkemizde konu üzerine yapılan bir çalışmada, Elazığ ve Diyarbakır illerinden temin edilen 310 adet tavuk but, göğüs, kanat, baget ve karaciğer numunesinde etkenin varlığı sırayla % 12; % 8; % 6,6; % 5 ve % 7,5 %; toplamda ise % 8,06 (25/310) olarak belirlenmiştir (Guran, & Ilhak, 2015). Samsun'da yapılan bir diğer çalışmada etkenin prevalansı modifiye atmosfer paketli sığır kıymalarında % 4 (50 numunede 2 adet), kuşbaşı örneklerinde % 2 (50 numunede 1 adet) olarak bildirilmiştir (Atasoy, & Gücükoğlu, 2017). Sakarya'da yapılan bir çalışmada ise et ve et ürünlerinde prevalansın % 1,98 (101 numunede 2 adet), pişmemiş çiğ köftelerde % 5,5 (18 numunede 1 adet) ve tüketime hazır pişmiş et dönerde % 8,3 (12 numunede 1 adet) olduğu rapor edilmiştir (Ersöz, & Coşansu, 2018). Muratoğlu ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada 319 et ürününün (71 salam, 50 sucuk, 52 sucuk, 50 pastırma, 36 pişmemiş köfte, 30 füme et ve 30 pişmiş döner) % 6,9' unda (22/319) *C. difficile* tespit ettiklerini ve bunların % 40,9' unun (9/22) R027 ribotipi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalıştıkları et ürünlerinde en yüksek *C. difficile* prevalansı ve R027 pozitiflik oranına sahip olan ürünün salam olduğunu vurgulamışlardır. Tavuk karkaslarında etkenin varlığını ve suşların antibiyotik duyarlılığının incelendiği bir başka çalışmada ise Marmara bölgesinde toplanan numunelerde pozitiflik % 37,7 (69/185) bulunmuş ve bunlardan 6 adedinin R027 ribotipi olduğu bildirilmiştir (Bingol ve ark., 2020).

Hampikyan ve arkadaşları (2018) ise etkeni 247 sığır karkasının 83'ünde ve 308 koyun karkas örneğinin 78'inde (% 25,3) izole ettiklerini bildirerek, 15 (% 18,1) sığır ve 6 (% 7,7) koyun izolatını ribotip 027 olarak tanımlamış, diğer hipervirulent tip olan ribotip 078'e rastlamadıklarını rapor etmişlerdir. Ülkemizden bildirilen son çalışmada Kayseri'de 100 sığır dışkısı, 100 karkas yüzey sürüntüsü, 20 mezbahane örneği (10 atık su, 10 çalışma alanı ve bıçak sürüntüsü) olmak üzere toplam 220 numunede *C. difficile* varlığı araştırılmış olup tespit edilen 12 izolatın 1'i mezbahane atık suyundan 11'i sığır dışkı numunelerinden izole edilmiştir (Abay ve ark., 2022).

2.3. Süt ve Süt Ürünleri

Türk Standartları Enstitüsü TS1018 (Nisan 2022)'e göre çiğ inek sütü, ineekten sağılarak elde edilen 40 °C'ın üzerinde ısıtılmamış veya eş değer etkiye sahip

herhangi bir işlem görmemiş veya ön ısıtma işlemine tabi tutulmamış ve ağız sütü (kolostrum) dışındaki meme bezi salgısıdır (Türk Standartları Enstitüsü[TSE], 2022a). Sütün temel bileşimi su, protein (kazein, serum proteinleri, β -laktoglobulin) karbonhidratlar (laktoz), yağ (trigliseridler, fosfolipitler, kolosterol, serbest yağ asitleri monogliseridler ve digliseridler), vitaminler (A, D, E, K), mineraller (K, Na, Ca, Mg, Cl ve fosfat) ve enzimlerdir (Wastra, Wouters, & Geurts, 2006). Taze sütün yaklaşık değerleri; yağ için % 4, kazein için % 2,6; diğer protein için % 0,70; laktoz için % 4,6; tuz için % 0,85 ve su için % 87,1'dir ve pH değeri 6,7'dir (Wastra ve ark., 2006). Bu zengin bileşimi sebebiyle süt hem memeliler hem de mikroorganizmalar için iyi bir besin ve enerji kaynağıdır.

Sütle potansiyel olarak ilişkili başlıca bakteriler *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Basillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* türleridir (Wastra ve ark., 2006). Bunlardan son üçü dışındakiler gram (+) bakterilerdir. Bakterilerin dışında süt ve süt ürünlerinde *Geotrichum candidum* gibi mayalar ile *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi küfler bulunabilir (Wastra ve ark., 2006). Bu mikroorganizmalar sütü fermente ederek süt ürünlerinin oluşmasına ve/veya sütün bozulmasına neden olurlar.

Sütte doğal olarak bulunan immunglobulinler, lizozim ve laktoferrin gibi bakteriyel inhibitörler, laktoperoksidaz-tiyosiyanat- H_2O_2 gibi nonspesifik inhibitörler, redoks potansiyeli ve O_2 seviyesi gibi faktörler bakterin gelişimini engeller ve inhibe edici etki sağlar. Ayrıca dışardan gelen antibiyotik, dezenfektan ve H_2O_2 gibi inhibitörler içerebilir (Wastra ve ark., 2006).

Tablo 2. TS 1018' e göre Çiğ İnek Sütünün Özellikleri

Özellikler	Sınırlar
Yoğunluk	1,028
Donma Noktası	-0,520 °C
Mastitis testi	Negatif
Protein, % (m/v), en az	2,8
Asitlik (Süt asidi), % (m/v), en az- en çok	0,135 - 0,200
Yağsız kuru madde, % (m/v), en az	8,5
İnhibitör madde	Bulunmamalı
Okside edici maddeler	Bulunmamalı
Karbonat ve formaldehit	Bulunmamalı
Toplam canlı bakteri sayısı, 30 C'de kob/mL, en çok	100000 *
Somatik hücre sayısı, adet/mL, en çok	500000 **

2.3.1. Pastörize Süt

Türk Standartları Enstitüsü TS1019'a göre pastörizasyon çiğ süte en az 72 °C'de 15 saniye uygulanan kısa süreli yüksek sıcaklık veya en az 63 °C'de 30 dakika uygulanan uzun süreli düşük sıcaklık veya eşdeğer etkiyi sağlayan diğer zaman-sıcaklık koşullarının kombinasyonunu içeren ve bu uygulamalardan hemen sonra alkali fosfataz testi yapıldığında ürünlerin negatif reaksiyon gösterdiği işlemdir (Türk Standartları Enstitüsü [TSE], 2022b). Pastörizasyon işlemi uygulanarak üretilen ve üretimden hemen sonra 6 °C'yi geçmeyecek sıcaklığa soğutulan süt pastörize süttür. Türk Standartları Enstitüsü TS 1019'e göre pastörize sütün özellikleri Tablo 3'te verilmiştir.

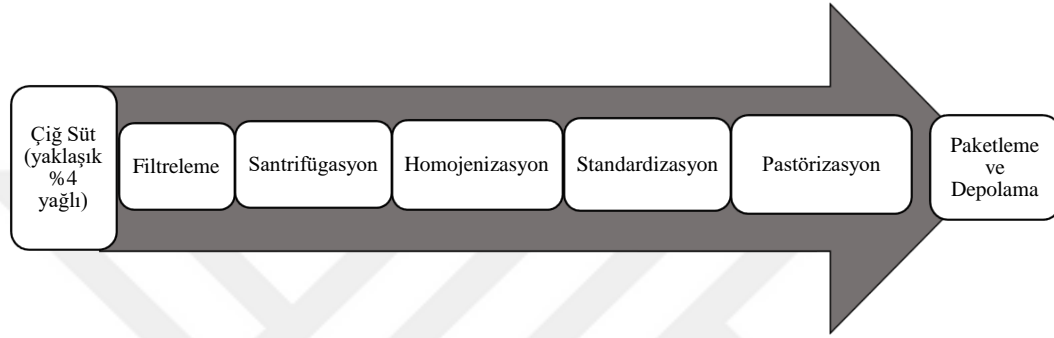
Tablo 3. Türk Standartları Enstitüsü TS1019'a göre Pastörize Sütün Özellikleri

Özellikler	Sınırlar
Yağsız Kuru madde, % (m/v), en az	8,0
Protein, % (m/m), en az	2,9
Fosfataz aktivitesi (fenol değeri olarak mg/0,5 mL), en çok	0,05
Peroksidad deneyi *	Pozitif/Negatif
Aflatoksin M1, (µg/kg), en çok	0,05
Natamisin	Bulunmamalı
Sorbik Asit	Bulunmamalı
Bitkisel Yağ	Bulunmamalı

Uygulanan hafif bir ısı işlem, örneğin 72 °C' de 15 saniye, mevcut olabilecek tüm patojenleri (özellikle *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., enteropathogenic *E. coli*, *Campylobacter jejuni* ve *Listeria monocytogenes* gibi) hiçbir sağlık tehlikesi kalmayacak şekilde öldürür (Wastra ve ark., 2006). *Staphylococcus aureus*'un bazı suşları ısı işlemde hayatta kalabilir ama tehlikeli miktarda toksin üretebilecek kadar çoğalamaz. Pastörizasyonla koliformlar, mezofilik laktik asit bakterileri ve psikrotroflar da öldürülür. Öldürülemeyenler arasında ısıya dayanıklı mikrokoklar, bazı termofilik streptokoklar ve bakteri sporları bulunur. Ancak *B. cereus* dışında bu mikroorganizmalar sütte çok hızlı üreyemezler. Patojen bir mikroorganizma olan *B. cereus* sütte ürediğinde kötü lezzet oluşturur. Özetle pastörize süt, tüketici için güvenlidir. Buzdolabında saklandığından en az 1

hafta raf ömrüne sahiptir ve lezzet ve besin değeri olarak taze sütte çok az farklıdır (Wastra ve ark., 2006).

Pastörize süt üretim prosesi Şekil 4'te verilmiş olup pastörize sütün bozulmasının en önemli nedeni özellikle ambalajlanması esnasında sütün çevredeki hava ve aerosollar yoluyla gram-negatif psikrotrof bakterilerle kontaminasyonudur (Lewis, & Deeth, 2014).



Şekil 4. Pastörize Süt Üretim Prosesi

2.3.2. Yoğurt

Popüler fermente süt ürünlerinden biri olan yoğurt, TS 1330 (2021) 'a göre inek sütü, koyun sütü, manda sütü, keçi sütü veya karışımlarından üretilen, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*' un simbiyotik kültürlerinin kullanıldığı ve TS 10935'e göre üretilen ve sonrasında ısı işlem görmeyen mamüldür (Türk Standartları Enstitüsü [TSE], 2021). Geleneksel olarak sade yoğurt üretimi, kaynatılarak suyu uzaklaştırıldıktan sonra ve 45-50 °C'ye soğutulan süte bir miktar yoğurt katılması ile üretilir. İnkübasyon 35-40 °C'de 3-5 saat yapılır. Ticari yoğurt üretiminde standadize edilmiş homojenize süt 80-85 °C'de 20-30 dakika veya 90-95 °C'de 3-5 dakika pastörize edilir (Türk Standartları Enstitüsü [TSE], 1993) ve 42-44 °C'de % 2-3 oranında starter kültür ilavesi yapılır (TSE, 1993). Starter olarak saf yoğurt kültürü ya da probiyotik bakteri de içeren kültürler kullanılabilir (Ghoddusi, & Thomas, 2017). İnkübasyon 42-44 °C'de 2-3 saat kadar (pH 4,6-4,7 oluncaya kadar) yapılır (TSE, 1993). İnkübasyon sıcaklığı azaldıkça fermentasyon süresi uzar ancak yoğurdun kıvamı daha katı olur (Wastra ve ark., 2006).

İnkübasyon sonrasında yoğurt kendine özgü renk ve görünüşte, toplam spesifik mikroorganizma sayısı en az 10^7 kob/g ve % laktik asit miktarı 0,6-1,5 arasındadır (TSE, 2021). Ortalama pH 4,4 (4,2-4,6); viskozite 400 mPA-S'dir (Wastra ve ark., 2006) ve yaklaşık yağ % 3,5; kazein % 2,5; laktoz % 3,7; diğer proteinleri % 0,8' dir (Wastra ve ark., 2006). Fermentasyonla yoğurdun laktoz içeriği azaltırken laktik asit miktarı artar. Çoğu vitamin seviyesi de fermentasyon öncesine göre azalır (Wastra ve ark., 2006). Ancak üretimde kullanılan starter kültürle ilişkili olarak bazı vitaminlerin miktarı artabilir (Tamime, 2006). Yoğurdun en önemli uçucu bileşikleri ise asetaldehit, asetik asit, diasetildir (Wastra ve ark., 2006).

Yoğurt fermentasyonunda proteolitik laktobasiller küçük peptitler ve valin başta olmak üzere serbest amino asitler oluşturarak streptokokların çoğalmasını arttırır. Streptokoklar ise anaerobik koşullar altında pirüvik asitten formik asit oluşturarak, ayrıca CO₂ üretimi yoluyla laktobasiller çoğalmasını arttırır (Wastra ve ark., 2006). Formik asidin uyarıcı etkisi yoğun şekilde ısıtılmış (kaynatılmış) sütte fark edilmez çünkü bu sütte laktozun parçalanmasıyla formik asit oluşmuştur. Bununla birlikte, streptokoklar tarafından formik asit üretimi yoğurt sütüne daha ılımlı ısı işlemlerin (örneğin, 85 °C'de 5 ila 10 dakika) uygulandığı endüstriyel uygulamalarda esastır. *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un birlikteliğinde, laktik asit, saf kültürlerine göre çok daha hızlı üretilir. Yoğurtta belli bir asitliğe ulaşıldıktan sonra streptokokların gelişmesi engellenirken, asidik ortama daha dayanıklı olan laktobasiller çoğalmaya devam ederler (Wastra ve ark., 2006).

2.3.3. Kefir

Kefir içinde laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayaları içeren, protein ve polisakkaritlerin kompleks bir matriksi olan fermente bir süt ürünüdür. Günümüzde kefir tanelerinin kullanıldığı geleneksel üretim ile starter kültürlerin kullanıldığı modern üretim olmak üzere 2 ana yöntemle kefir üretilir (Tamime, 2006). Geleneksel yöntemde 18-25 °C'ye soğutulmuş 100 mL süte 2-10 gram kefir tanesi katılır ve 18-24 saat inkübasyon sonrası kefir taneleri ayrıldıktan sonra karıştırılarak soğutulur. Kefir taneleri tekrar kullanılmak üzere yıkanır (Tamime, 2006). Modern yöntemde ısı işlem uygulanmış ve 32-35 °C'ye soğutulmuş süte

starter kültür inoküle edilir ve son pH 4,4-4,5 olacak şekilde 10-15 saat inkübasyon sonrasında ürün karıştırılır, soğutulur ve paketlenir (Tamime, 2006).

Kefir kültürleri termofilik/mezofilik laktik asit bakterilerinin ve mayaların farklı karışımlarından oluşur (Tamime, 2006). Kefir fermentasyonunda laktik asit ve alkol üretilir. Laktik asit içeriği % 0,7-1 arasında ve alkol içeriği % 0,05-1 arasındadır (Wastra ve ark., 2006). Bu sayede hoş ve ekşi bir tat oluşurken, düşük pH, düşük redoks potansiyeli, inhibisyon etkisi olan ayrışmamış asitler ve antimikrobiyal aktivitesi olan bileşikler sebebiyle istenmeyen organizmaların inhibe edildiği bir ortam oluşur (Wastra ve ark., 2006).

2.4. Probiyotikler ve *C. difficile* Enfeksiyonlarında Kullanımı

Probiyotik bakteriler tarafından üretilen vitaminler (folat, kobalamin [B₁₂], menakinon [vitamin K₂], riboflavin, tiamin) ve ekzopolisakkaritler ile sağlığa olumlu etkilerde bulunurlarken, bakteriyosin gibi maddeler patojenler üzerine inhibitör etki gösterirler (Tamime, 2006). Probiyotiklerin temel faydalı etkileri immun-modülatör, bağırsak florasını dengeleyici, antibakteriyel, anti-inflamatuar, anti-mutajenik, antioksidant ve anti-viral etki olarak tanımlanmıştır (Mousavi ve ark., 2020).

Clostridioides difficile tedavisinde uzun süreli antibiyotik kullanımı gastrointestinal sistem mikrobiyomunu bozar ve patojene rekabet avantajı kazandırır (Tamime, 2006). Yoğurt tüketiminin antibiyotikle ilişkili koliti önleyip önlemediği veya iyileştirip iyileştirmediğinin test edildiği bir çalışmada yoğurtla tedavi edilen hamsterlarda ölüm oranının % 100 olduğu ve tüm hayvanlarda şiddetli kolitin histolojik değişikliklerinin görüldüğü dolayısıyla hamster modelinde yoğurdun *C. difficile* kolitinin önlenmesindeki olası etkinliğini destekleyen hiçbir kanıt bulunamadığı bildirilmiştir (Kotz, Peterson, Moody, Savaiano, & Levitt, 1992). Ancak bazı Bifidobacterium türlerinin supernatantlarının, insan enterosit hücre kültüründe *C. difficile* adhezyonu ve büyümesine karşı antagonist etkisi gözlenmiştir (Trejo ve ark., 2006).

Kefir bakterisi olan *Lentilactobacillus kefiri* (*L. kefiri*)'nin çeşitli fare modellerinde yan etki olmaksızın giardiasis, alkollük olmayan yağlı karaciğer, x ışına bağlı bağırsak hasarına karşı ve hatta CDI'ya karşı sağlığa olumlu etkileri olduğu

raporlanmıştır (Spinler ve ark., 2016). *L. kefir* suşlarındaki S-tabaka (S-layer) proteinlerinin *C. difficile* toksinlerinin (TcdA ve TcdB) etkilerini antagonize etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Carasi, Trejo, Pérez, De Antoni, & Serradell, 2012). Başka bir çalışmada kefirde izole edilmiş bakteri ve mayalardan oluşan bir karışım ile hamsterlarda *C. difficile* kaynaklı enterokolite karşı koruma sağlandığı bildirilmiştir (Bolla, Carasi, Bolla, De Antoni, & Serradell, 2013). Bir diğer çalışmada ise deneysel olarak enfekte edilmiş farelere kefir verildiğinde dışkıda ortalama nispi *C. difficile* DNA konsantrasyonunun beklenmedik şekilde arttığı ancak toksin seviyelerinin önemli ölçüde yükselmediği bildirilmiş ve bu durumun çalışmada kullanılan *C. difficile* suşu ile ilişkili olabileceği yorumlanmıştır (Spinler ve ark., 2016).

2.5. Nisin

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve hücre dışı olarak salınan küçük peptidlere veya biyoaktif proteinlere bakteriyosin denir (Da Costa, Voloski, Mondadori, Duval, & Fiorentini, 2019). Nisin *L. lactis* ssp. *lactis* tarafından üretilen, termostabil, hidrofobik ve katyonik bir antimikrobiyal peptittir. Nisin, bakteriyosin sınıflandırılmasında lanthionine ve β -metil lanthionine içeren küçük (<5 kDA) peptit lantobiyotiklerin yer aldığı Grup Ia' da yer alır (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001).

Etkisini sitoplazmik membran üzerine gösterir. Sitoplazmik zar/membranda, gözenek oluşumunu tetikleyerek membran potansiyelinin dağılmasına ve küçük metabolitlerin (amino asitler, K^+ ve internal adenosine trifosfat gibi) akışına yol açar (Ali ve ark., 2013; Da Costa ve ark., 2019). Ayrıca hücre duvarı biyosentezi için zara bağlı bir öncü olan lipid II molekülü ile etkileşime girer. Sonuç olarak hücre parçalanmasına ve ölümüne sebep olur (Ali ve ark., 2013). Etki spektrumunda *S. aureus*, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* ssp., *Mycobacterium* ssp., gibi patojen mikroorganizmalar bulunmaktadır.

Nisinin bakteri sporları üzerine de inhibisyon etkisi bulunmaktadır. Etki mekanizması yapısında bulunan dehidrobutirin ve dehidroalanin amino asitlerinin zardaki sülfidril gruplarıyla reaksiyona girmesi sonucunda sporun çimlenmesinin

önlenmesiyle gerçekleşmektedir. Böylece termosensitif faza ulaştıktan sonra çimlenme durmaktadır (Kurt, & Zorba, 2005).

İnhibitör etkisi sebebiyle bakteriyosinler alternatif veya tamamlayıcı tedavi olarak öne sürülmektedir (Bartoloni ve ark., 2004; Hanchi ve ark., 2017). Nisinin *C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde vankomisin ve metronidazole alternatif olup olmayacağını sorgulandığı öncü çalışmalardan birinde vankomisin ve metronidazolün minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC₉₀) değeri her ikisi içinde 0,8 mg/L olarak bulunurken; nisin 0,256 mg/L MIC₉₀ değeri ile *C. difficile*'ye karşı en aktif ajan olarak bildirilmiştir (Bartoloni ve ark., 2004). Nisin vejetatif *C. difficile* ATCC 9689 formlarını inhibe ettiği ancak 120 dakika maruziyette 40 nM nisin vejetatif hücreleri tek başına tamamen inhibe edemediği, bunun yerine 20 nM nisin ile 0,2 mM lizozimin birlikte kullanımının 30 dakika inkubasyonda etkeni tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Chai ve ark., 2015). Nisinin *C. difficile*'nin klinik izolatlarına karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise Nisin A ve Z'nin her ikisinin de çalışılan tüm suşları inhibe ettiği bildirilerek, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) sırayla 0,8 µg/mL ve 6,2 µg/mL olarak tahmin edilmiştir (Le Lay ve ark., 2016). Ayrıca bu çalışmada 3,2 µg/mL dozda nisin A'nın ile 1 ve 24 saatlik maruziyet sonrasında spor canlılığının % 82 ila 99 arasında değiştiği ve daha yüksek konsantrasyonlarda, nisinin canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Le Lay ve ark., 2016).

Nisin, patojenlere karşı yüksek bakterisidal etki gösterirken *Bacterioides* ve *Prevotella* gibi yaygın gastrointestinal mikrobiyotaya karşı zayıf bakterisidal etki gösterir. Deney hayvanı çalışmaları nisinin kalın bağırsaktan emiliminin çok az olması sebebiyle sistemik toksemi yapma ihtimalinin düşük olduğunu göstermiştir (Ali ve ark., 2013). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsüne alınarak gıdalarda kullanımına izin verilmiştir. Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (2023) eklerinde E234 kodu ile "Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Katkı Maddeleri Listesi" nde yer bulmuş olup olgunlaştırılmış ve işlenmiş peynirde maksimum 12,5 mg/l dozda, pastörize yumurtada 6,25 mg/l dozda kullanımına izin verilmiştir. *C. difficile* 3195 suşu ile yapılan bir çalışmada nisin MIC değeri vejetatif hücreler için 5,20 µg/ml ve endosporlar için 3,47±1.50 µg/ml olarak bildirilerek;

yüksek basınç ve ısı işlemlerle birlikte nisin kullanımının *Clostridium* spp. endosporlarının inaktivasyonunu artırdığı ve gıdalarda uygulanabilir olduğu önerilmiştir (Hofstetter ve ark., 2013).

Tüm bu literatür bilgisi ışığında, toprak, su, gübre, toz, yem ve sağım ünitesi insan veya sığır kaynaklı *C. difficile* sporlarıyla kontamine olabilir ve bu sporlar çapraz kontaminasyonla gıda maddelerine geçebilirler. Mevcut çalışmalarda et ve et ürünlerinde etkenin izole edildiği bildirilirken, süt ve süt ürünlerinden etkenin izole edilmesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışma ile deneysel olarak *C. difficile* sporları inoküle edilen inek sütütünden üretilen pastörize süt, yoğurt ve kefirde klasik kültürel metotlarla etkenin davranışının ve canlılığının belirlenmesi; etkenin bir bakteriyosin olan ve GRAS bir gıda koruyucusu olarak kabul edilen nisin kullanılarak pastörize inek sütü ortamında inhibe edilmesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmayla sütün bir bulaşma kaynağı olarak etkinliğinin irdelenmesi, süt ve süt ürünlerinden etkenin izolasyonunda yaşanan güçlüklerin anlaşılması ve fermente süt ürünlerinin bulaşmada, korunmada veya tedavide rolünün daha iyi anlaşılması hususlarında literatüre katkı sunulması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada Samsun İli, Atakum ilçesinde bulunan yaklaşık 50 başlık bir çiftlikten temin edilen antibiyotik içermeyen çiğ süt kullanıldı. Kefir ve yoğurt üretiminde yüksek sıcaklıkta pastörize edilmiş tam yağlı inek sütü kullanıldı. Sütlerin *C. difficile* ile kontamine olmadığı ekimler yapılarak onaylandı.

3.1.1. *C. difficile* Suşu

Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans ve Biyolojik Ürünler Dairesi Bşk., Kültür Koleksiyonundan temin edilen *C. difficile* ATCC 9689 suşu kullanıldı.

3.1.2. Yoğurt Kültürü

Çalışmada *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* içeren yoğurt kültürü Maysa Gıda (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edildi.

3.1.3. Kefir Kültürü

Çalışmada kefir üretimi için kullandığımız kefir kültürü Doğadan Bizim (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edildi. Kefir üretimi firmanın üretim önerileri doğrultusunda kültür ilavesi sonrası sütün 30 °C 'de 18 saat inkübasyonu ile gerçekleştirildi. Kullanılan kefir kültürünün mikrobiyolojik kompozisyonuna ilişkin veri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Ticari kefir mayasının mikrobiyolojik yapısı

Bakteriler	Mayalar
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ssp. <i>chevalieri</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>Lactobacillus kefir</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	
<i>Bifidobacterium animals</i>	

3.1.4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

- Anaerotest (Merck-1.15112.0001)
- Anaerocult A (Merck-13829.0001)
- Tryptic Soy (TS) broth (Merck- 1.05459.0500)
- Brain Heart Infusion (BHI) broth (Merck- 1.10493.0500)
- Brain Heart Infusion (BHI) agar (Merck- 1.03870.0500)
- de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (Merck- 1.10660.0500)
- M17 agar (Merck-1.15108.0500)
- Plate Count Agar (PCA) (Merck-1.105463.0500)
- Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid- CM0139)
- Tamponlu Pepton Water; ISO 6579'a göre (Merck 1.072228-0500)
- *C. difficile* selektif supplement (Oxoid- SR0096E)
- Sodium taurocholate- (Sigma- 86339)
- Maya Ekstraktı (Merck-1.03753-0500)
- Nötral Red (Merck -1.01369.0025)
- D(-) Fruktoz (Merck- K25469623 850)

- *C. difficile* Test Kiti (Oxoid- DR1107A)
- Gram Boyama Kiti (Merck- 111885)

3.1.5. Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi (Shimadzu, AU-X320-Japonya)
- pH/ORP metre (Hanna Instruments, HI 2221-ABD)
- Distile Su Cihazı (Nüve, NS 103-Türkiye)
- Mc Farland Densitometre (Biosan, DEN-1B- Letonya)
- Süt Analiz Cihazı (Funke Gerber, Lactostar-Almanya)
- Stomacher (İnterscience, Bagmixer 400 CC- Fransa)
- Su Banyosu (Nüve, BM 402-Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, NF800- Türkiye)
- Etüvler (Nüve, EN120-Türkiye)
- Otoklav (Nüve, OT090L-Türkiye)
- Vorteks (Heidolph-Almanya)
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcılar (Heidolph, MR Hei-Standard, Almanya)
- Class II Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini (Nüve, MN 120-Türkiye)
- Laminer Hava Kabini (Nüve, LN 090-Türkiye)
- Koloni Sayıcı (İsolab, Almanya)
- PZR cihazı (Bio-Rad, T100 Thermal Cyclers, ABD)
- Elektroforez (Clever Scientific, nanoPSC-300- İskoçya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Spectroline, TD-2100 E/F-ABD)
- Faz Konstrast Mikroskop (Nikon, Eclipse E200- Japonya)
- Işık Mikroskobu (Olympus- CH20BIMF200- Japonya)
- -20 C'lik derin dondurucu (Arçelik-Türkiye)
- +4 C'lik buzdolabı (Uğur-Türkiye)

3.1.6. BHI-YST-CC Besiyeri

Besiyeri, formülasyonda Tablo 5'te belirtildiği şekilde BHI agar, maya ekstraktı, nötral kırmızısı ve D(-) fruktozun hassas terazide tartılıp 990 mL distile su ilavesi sonucunda ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda iyice çözündürülmesi ve karıştırılmasıyla hazırlandı. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanan besiyeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra *C. difficile* selektif supplement, % 10'luk sodyum taurokolat çözeltisi (her 10 ml steril saf su için 1 gram sodyum taurokolat) filtre edilerek ilave edildi. Besiyerinin son pH'sı 7,4 ($\pm 0,1$) olarak ayarlandı. Her petriye yaklaşık 20 ml besiyeri döküldükten sonra petri plakları 3-4 saat boyunca kurutuldu.

Tablo 5. BHI-YST-CC Agar Besiyerinin Formülasyonu

İçindekiler	Miktar/litre
BHI agar	52,0 g
Maya Ekstraktı	5,0 g
Nötral Kırmızı	0,03 g
D (-) Fruktoz	0,4 g
Sodyum Taurokolat	1,0 g
D-Cycloserine	250,0 mg
Cefoxitin	8,0 mg
Distile Su	990 ml

3.1.7. Nisin

Lactococcus lactis tarafından üretilen nisin ticari formu Sigma-Aldrich (N5764, ABD) firmasından temin edildi. Ticari preparat % 2,5 oranında nisin A içermektedir (10^6 IU/g). Stok solüsyon hazırlamak için (1000 ppm) 0,4 gram nisin (10 mg etken içerir), 10 ml 0,02 N hidroklorik asit (HCl) içinde çözdürüldü (Food and Agriculture Organization[FAO], 2013). Kullanımdan hemen önce sütteki son konsantrasyonu 7,5 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm olacak şekilde seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. *C. difficile* Suşunun Canlandırılması ve Doğrulanması

Referans bakteriyi canlandırmak amacıyla stok kültürden, taze hazırlanmış ve içinde % 5 koyun kanı bulunan TSI ve BHI agarlara, ayrıca BHI ve TSI sıvı besiyerlerine öze ile ekim yapıldı. Anaerobik koşullarda 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası bulanıklık görülen sıvı besiyerleri ile üreme olan petrillerdeki koloniler doğrulama işlemine tabi tutulmuştur. Stok kültürün doğrulanması amacıyla içinde % 0,5 maya ekstraktı, % 0,1 sodyum taurakolat, % 0,03 nötral red ve *C. difficile* selektif supplement (1 tüpte 125,0 mg D-sikloserin, 4,0 mg sefoksitin) bulunan selektif ve ayırıcı özelliğe sahip koyun kanı içeren (% 5) BHI-YST-CC Agar'a ekim yapılmıştır. 37 °C'de anaerobik koşullarda 4 günlük inkübasyonu takiben yeknesak yapılı, etrafları sarımsak, boyutları 1 mm ile 2 mm arasında değişen camsı/şeffafimsı koloniler üremiştir. Gram (+) olarak boyanan sporlu basiller kültürün saf ve pozitif olduğunu göstermiştir. Bunlara ilaveten, kültürün onaylanması amacıyla *C. difficile* Hızlı Test Kiti'de (Oxoid) kullanıldı.

3.2.1.1. *C. difficile* Hızlı Test Kitinin Prensipli ve Uygulanması

Bu kit hızlı ve basit bir latex aglutinasyon testi olup hem sıvı besiyerinden hem de katı besiyerinden elde edilmiş mikroorganizmalara uygulanabilmektedir. Testin içinde bulunan *C. difficile* Reagent (1099) içerisinde tavşandan elde edilmiş *C. difficile* hücre duvarı antijenlerine spesifik Ig G ile kaplanmış lateks partiküller bulunmaktadır. Bu reagent ile test edilen örneğin karıştırılması sonrasında örnek *C. difficile* açısından pozitif ise 2 dakika içerisinde aglutinasyon oluşmaktadır. Ancak sıvı besiyerinden yapılan testlerde *C. sordellii*, *C. glycollicum* ve *C. bifermentans* ile çapraz reaksiyon oluşabilmektedir. Bunun için sıvı besiyerinden yapılan testte görülen pozitif reaksiyonların selektif katı besiyerinde izole edilmiş tipik kolonilerle de tekrar edilmesi gerekmektedir.

Testin uygulanmasında; reaksiyon kartı üzerindeki alanda bir damla izotonik tuzlu su (% 0,85) ile seçilen koloniden öze dolusu alınan örnek pürüz kalmayacak

şekilde süspansedilir. Daha sonra üzerine bir damla *C. difficile* reagent (1099) damlatılarak hafifçe karıştırılır. 2 dakika içerisinde aglütinasyon görülmesi pozitif olarak değerlendirilir. Saf olmayan kolonilerdeki aglütinasyonun zayıf, saf kolonilerde ise daha güçlü olduğu görüldü.

3.2.1.2. PZR Analizi

DNA ekstraksiyonu saf koloni üzerinden ticari ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher, Invitrogen DNA Ultra Pure, ABD) kullanılarak yapıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) karışımında toplam hacim 25 µL olacak şekilde 0,5 µl Taq DNA Polimeraz (5 U/µl); 2,5 µl Taq Buffer (10X); 1,5 µl MgCl₂ (25 mM); 0,5 µl dNTP Miks (10 mM); 10 µl Deiyonize Distile Su; 1'er µl 10 µM'lık primer ve 5 µl ekstrakte DNA kullanıldı. Kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 6'da verilmiştir. Reaksiyon Thermal Cycler cihazında ilk denaturasyon 95 °C'de 3 dakika; takibinde denaturasyon 95 °C'de 30 saniye; bağlanma derecesi 65 °C'den her döngüde 1 °C azalacak şekilde 30 saniye; uzama 72 °C'de 30 saniye toplamda 11 döngü olarak programlandı. İlk 11 döngü sonrasında denaturasyon için 95 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye ve son uzama 72 °C'de 30 saniye olarak 30 döngü olarak gerçekleştirildi (Özgen, 2018).

Elektroforez için % 1,5'lik jel; 0,75 gram agaroz ve 50 mL 1X TAE buffer ile mikrodalga kullanılarak hazırlandı. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğuyan jel 0,1 µl/ml DNA boyasıyla [etidyum bromür (Thermo Fisher, Invitrogen, ABD)] karıştırıldıktan sonra jel tankına döküldü (Özgen, 2018).

Hazırlanan agaroz kuyucuklara 6X loading dye ile karıştırılan örneklerden 20 µL aktarıldı. Bir kuyucuğa DNA ladder ve 6X loading dye eklendi (Özgen, 2018). Elektroforez işleminde 110 volt, 90 amperde yürütüldü.

Tablo 6. PZR ile Doğrulamada Kullanılan Primerler (Persson, Torpdahl, & Olsen, 2008)

Hedef Gen	Primer Adı	Sekans (5'-3')	Primer Konsantrasyonu (µM)	PZR Ürünü Boyutu (bp)
16S rDNA	tpi (F)	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	0.05	1062
16S rDNA	tpi (R)	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	0.05	1062
tcdA	tcdA (F)	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGG TA	0.6	629
tcdA	tcdA (R)	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.6	629
tcdB	tcdB (F)	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAG GTG	0.4	410
tcdB	tcdB (R)	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGT A	0.2	410

3.2.1.3. Sekans Analizi

16S rDNA üzerine yapılan spesifik PZR işlemi sonrası elde edilen ürünün dizi analizi hizmet alımı şeklinde “Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM)’nde gerçekleştirildi.

3.2.2. Sütün Pastörizasyonu, Sporların Süte İnokülasyonu ve Nisin İlavesi

Samsun İli, Atakum ilçesinde bulunan yaklaşık 50 başlık çiftlikten emin edilen sütlere son konsantrasyonu 10^6 spor/mL olacak şekilde *C. difficile* spor süspansiyonu inoküle edildi. Çiğ süt pastörizasyon maksatlı olarak süt 63-65 °C 'de 30 dakika boyunca ısıtma işlemine tabi tutuldu. Ardından pastörize süt *C. difficile* sporlarının pastörize sütte ne kadar süreyle canlı kalabildiğini belirlemek maksadıyla kontrol grubu (A) ve *C. difficile* sporlarına nisin inhibisyon etkisini belirlemek maksadıyla deneme gruplarına (B, C, D ve E) ayrıldı. Deneme grubu sütlere grup bazında aseptik olarak 7,5 ppm (B), 12,5 ppm (C), 25 ppm (D) ve 50 ppm (E) dozunda nisin ilave edilerek iyice çalkalanıp homojen hale getirildi. Steril kaplara eşit miktarlarda (50 ml) pay edilen kontrol ve deneme grubu sütler +4 °C 'de 20 gün boyunca muhafaza edildi.

3.2.3. Yoğurt Üretimi ve Spor İnokülasyonu

Çiğ süt *C. difficile* sporları ile 10^4 ve 10^6 spor/ml konsantrasyonunda olacak şekilde inoküle edilip $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5-10 dakika ısıtılma maruz bırakıldı. $43\text{-}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulan numuneler daha sonra yoğurt kültürü ile mayalandı. İyi çalkalanıp homojen hale getirilen deneme grupları eşit miktarda 100 ml'lik steril mini yoğurt kaplarına pay edildi. Takibinde pH 4,6 ($\pm 0,2$) seviyesine ulaşınca kadar yaklaşık 3-4 saat boyunca $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yoğurtlar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında 20 gün boyunca muhafaza edildi.

3.2.4. Kefir Üretimi ve Spor İnokülasyonu

Çiğ süt *C. difficile* sporları ile 10^4 ve 10^6 spor/ml olacak şekilde inoküle edilip $63\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika ısıtılma maruz bırakıldı. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulan numuneler daha sonra kefir kültürü ile mayalandı. Homojen hale getirilen deneme grupları eşit miktarda 100 ml'lik steril kaplara pay edildi. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki inkübasyon 18-24 saat sonra sonlandırıldı (pH yaklaşık $4,6 \pm 0,2$) ve numuneler buzdolabında $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı.

3.2.5. Spor Stok Süspansiyonu Eldesi

Brain Heart Infusion (BHI) agarda üretilip doğrulanmış bir koloni TS sıvı besiyerine ekildi, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24-36 saat inkübasyon sonrası (Mc Farland değeri yaklaşık 1,5-2) taze hazırlanmış BHI agara 250 μl ekim yapıldı. Anaerobik koşullarda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de en az 5 gün inkübasyon ile bakterilerin sporlanması teşvik edildi. Spor biriktirilmesi için petrilere 2-5 ml steril soğuk su eklendi ve koloniler öze ile hafifçe kazındı. Su-spor karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerinde toplandı. Biriktirilen spor süspansiyonları 1 gece $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildikten sonra spor eldesi için tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından üstteki sıvı faz uzaklaştırıldı ve spor peleti 10 ml steril PBS ile süspansiyon edilip vorteks ile homojenize edildi. Yeniden 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjasyon sonrası sıvı faz uzaklaştırıldı ve pelet 10 mL PBS ile tekrar resüspansiyon edildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandıktan sonra süspansiyon son kez santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı. Alkol şoku amacıyla 5

ml PBS ve 5 ml % 95 etanol eklenip, vortekslenerek 1 saat bekletildi. Süre sonunda tüp 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip sıvı faz uzaklaştırıldı. Pelet 10 ml PBS ile 5 kez yıkandıktan (3000 rpm'de 10 dakika) sonra 5 ml PBS ile karıştırıldı (Edwards, & McBride, 2016).

3.2.6. Spor Yapılarının İncelenmesi ve Spor Sayımı

Spor yapılarının incelenmesi ve sayımında kullanılmak amacıyla % 0,7' lik agarose jel hazırlandı. Sıvı haldeki jel lam üzerine çok ince bir katman oluşturacak şekilde yayıldı ve kuruması için 2-3 dakika beklenildi. Ardından lamda belirlenen 1x1 cm²'lik alana desimal dilüsyonları hazırlanmış stok süspansiyonundan 5 µl spor eklenerek yayıldı, üzeri lamel ile kapatılarak faz kontrast mikroskopta spor yapıları incelenerek sayıldı (Edwards, & McBride, 2016).

Spor sayımının doğrulanması amacıyla stok süspansiyondan hazırlanan dilüsyonlar içinde % 0,5 maya ekstratı, % 0,1 sodyum taurakolat, % 0,03 nötral red ve *C. difficile* selektif supplement içeren (1 vialinde 125,0 mg D-sikloserin, 4,0 mg sefoksitin) bulunan BHI-YST-CC agara ekildi. Anaerobik koşullarda 37 °C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası çevreleri kırmızıdan sarıya dönen, camısı, kenarları dantela şeklinde görülen koloniler sayıldı. Koloniler ayrıca test kiti ile onaylandı.

3.2.7. Mikrobiyolojik Analizler

Mikrobiyolojik analizler için süt, yoğurt veya kefir deneme gruplarından (10 ml veya 10 g) tartılıp 90 ml peptonlu su ile homojenize edildi. Uygun dilüsyonlardan kullanılan besiyerlerine 0., 5., 10., 15., ve 20. günlerde ekim yapıldı. Petrilere üreyen 30-300 arasındaki koloniler sayım için seçildi. Sayım sonuçları mümkün olabildiğince ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması bulunarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve kob/ml veya kob/g olarak kayıt edildi.

$$N = \frac{C}{V(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$$

N: Koloni Sayısı kob/g veya kob/mL

C: Ardışık iki dilüsyonda sayılan tüm petrilerin toplamı

V: Ekim yapılan hacim

n1: Ardışık iki dilüsyondan daha küçük seyreltme faktörüne sahip olandan sayılan petri sayısı

n2: Ardışık iki dilüsyondan daha büyük seyreltme faktörüne sahip olandan sayılan petri sayısı

d: Ardışık iki dilüsyondan daha küçük seyreltme faktörüne sahip olanın dilüsyon faktörü

Petrilerdeki koloni sayısı 30'dan az ise ekim yapılan en küçük seyreltmeye göre örnekteki koloni sayısı hesaplandı.

3.2.7.1. *C. difficile* Sayımı

Süt, kefir ve yoğurt örneklerinden *C. difficile* analizi için peptonlu su kullanarak yapılan 1:10'luk dilüsyonlara ilaveten, düşük spor konsantrasyonuna sahip olduğu düşünülen kefir ve yoğurt örneklerinde 1:2'lik dilüsyonlar da hazırlandı. Vejetatif forma geçen *C. difficile* bakterilerini saf dışı bırakıp spor formda olanların sayısını belirlemek için peptonlu suda dilüe edilen numunelerin her biri öncelikle 80 °C'de 5 dakika veya 65 °C'de 30 dakika ısıtılma maruz bırakıldı. Isıl işlem sonrasında Maximum Recover Dilüent (MRD) ile seri dilüsyonlar hazırlandı. Dilüsyonlardan içinde % 0,5 maya ekstraktı (Y) ve % 0,1 sodium taurokolat (ST) bulunan Brain Heart Infusion (BHI-YST-CC) agarın yüzeyine 0,1 ml ekim yapıldı. 48-72 saat 37 °C'de anaerobik ortamda inkübasyon sonucu oluşan sarı renkli, camsı ve kenarları dantela şeklinde olan koloniler *C. difficile* olarak sayıldı.

3.2.7.2. Toplam Aerobik Mezofil Bakteri (TAMB) Sayımı

Toplam aerobik mezofil (TAMB) sayımı için pastörize süt, kefir ve yoğurt numunelerinden 10⁶ basamağına kadar hazırlanan desimal seri dilüsyonlardan Plate Count Agar (PCA)'a 100 µl ekim yapıldı ve 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyerinde gelişen tüm koloniler sayıldı ve kayıt altına alındı.

3.2.7.3. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Sayımı

Laktik asit bakterilerinin sayımı için kefir ve yoğurt numunelerinden 10^{-6} basamağına kadar hazırlanan desimal seri dilüsyonlardan 100 µl yayma plak tekniği ile de Man Rogosa Sharpe (MRS) Agara ve M17 agara ekim yapıldı. MRS agar içeren petripler anaerobik ortamda; M17 Agar içeren petripler aerobik ortamda 37 °C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petriplerde üreyen koloniler sayıldı.

3.2.7.4. Maya Sayımı

Kefir örneklerinde maya sayımı için 10^{-6} basamağına kadar hazırlanan desimal seri dilüsyonlardan 100 µl yayma plak tekniği ile % 10 laktik asit içeren Potato Dextrose Agar (PDA)'a ekim yapıldı. 25 °C'de 3-5 gün inkübe sonrasında besiyerinde gelişen tüm maya kolonileri sayıldı.

3.2.8. Fiziksel ve Kimyasal Analizler

Çalışmada kullanılan sütlerin yağ, protein, laktoz, kuru madde, yoğunluk değerleri LactoStar cihazı (Funke Gerber, Almanya) ile belirlendi.

3.2.8.1. pH

Çalışmada pH ölçümü pH/ORP metre (Hanna, HI 2221, ABD) ile yapıldı.

3.2.8.2. Titrasyon Asitliği

3.2.8.2.1. Çiğ Sütün ve Pastörize Sütün Titrasyon Asitliği

Soxhlet-Henkel (°SH) cinsinden asitlik derecesi için 25 ml süt numunesi, N/4 lük sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ve % 2'lik fenolftalein çözeltisi (2 g fenolftalein % 96'lık etil alkolde çözündürülüp aynı alkol ile 100 ml'ye tamamlandı) ile titrasyon yapıldı ve aşağıdaki formülle titrasyon asitliği hesaplandı.

$$\text{Asitlik Derecesi } (^{\circ}\text{SH}) = 4 \times V$$

V: Titrasyonda harcanan sodyum hidroksit (ml) çözeltisi

Sütün asitlik derecesini % süt asidi cinsinden bulmak için, Soxhlet Henkel Metodu ile SH olarak bulunan değer 0,0225 faktörü ile çarpıldı. Sonuç, Türk Standardı TS 1018:2002 ile karşılaştırılmak üzere kaydedildi.

3.2.8.2.2. Kefirin Titrasyon Asitliği

Kefir numunelerinde titre edilebilir asitlik tayini için 25 ml kefir numunesine 0,5 ml % 1'lik fenolftalein çözeltisinden (1 g fenolftalein % 95'lik etanolde çözülüp 100 ml'ye tamamlandı) 0,5 ml katılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile yaklaşık 30 saniye boyunca sabit pembe renk oluşuncaya kadar titre edildi. Asitlik aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Asitlik Derecesi } \% = \frac{V \times 0,1 \times 0,09}{25} \times 100$$

V: Titrasyonda harcanan sodyum hidroksit çözeltisinin hacmi (ml)

3.2.8.2.3. Yoğurdun Titrasyon Asitliği

Yoğurt numunelerinde titre edilebilir asitlik tayini TS 1330:2021'e göre yapıldı. Bunun için 10 gram yoğurt numunesi üzerine kaynatılıp 40 °C'ye kadar soğutulan 10 ml distile su ilave edildi. Cam baget ile iyice ezilen karışıma % 1'lik fenolftalein çözeltisinden (1 g fenolftalein % 95'lik etanolde çözülüp 100 ml'ye tamamlandı) 0,5 ml katılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile yaklaşık 30 saniye boyunca sabit pembe renk oluşuncaya kadar titre edildi. Asitlik aşağıdaki formülle hesaplandı. Sonuçlar, Türk Standardı TS 1330:2021 ile karşılaştırılmak üzere kaydedildi.

$$\text{Asitlik Derecesi } \% = \frac{V \times 0,1 \times 0,09}{10} \times 100$$

V: Titrasyonda harcanan sodyum hidroksit çözeltisi (ml)

3.2.9. Verilerin Düzenlenmesi ve İstatistiki Analiz

Deneme gruplarının paralellerinden elde edilen koloni sayılarının aritmetik ortalaması alınmıştır ve elde edilen koloni sayısı Excel programı ile log10 tabanına dönüştürüldü.

Deneme gruplarının paralellerinden elde edilen pH ve titrasyon asitliği değerlerinin aritmetik ortalaması alındı.

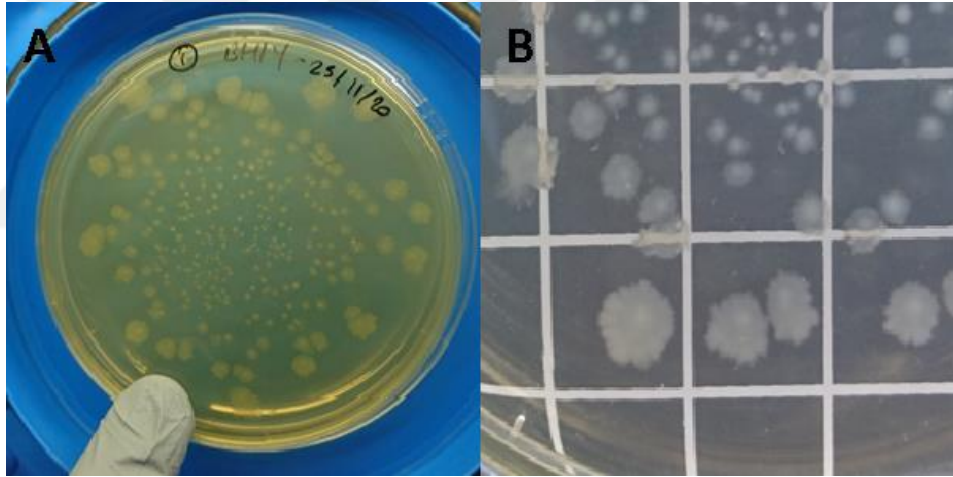
Düzenlenmiş verilerin varyans analizleri JAMOVİ Version 2.3 (Bilgisayar Yazılımı) programı kullanılarak yapıldı. Deney gruplarının ortalama değerleri arasındaki farklar “Varyans Analizi” ve PostHoc Tukey çoklu karşılaştırma testi veya Bonferroni düzeltmesi yapılarak belirlendi. İki bağımsız gruba ait farklılıklar ise parametrik şartlar sağlandığında Independent t- testi ile parametrik şartlar sağlanmadığında Mann Whitney U testi ile belirlendi. Deney gruplarının ortalama değerleri arasındaki farklılık için ikili karşılaştırma testi (DSCF) kullanıldı. Tüm sonuçlar $p < 0,05$ önem düzeyine göre değerlendirildi ve yorumlamaları yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. *C. difficile* Suşunun Kültürü, Doğrulanması ve Kültür için Uygun Besiyerin 4.2. in Belirlenmesi

4.1.1. Farklı Kültür Ortamlarında *C. difficile* Koloni Görünümü

Clostridioides difficile suşuna ait Kanlı agar, BHI agar (% 0,5 yeast ekstrat içeren Brain Heart Infusion Agar besiyerinde yayma plak yöntemi ile ekilen) ve FBHIYST-NR (Fruktoz, % 0,5 maya ekstraktı, % 0,1 sodyum taurakolat, % 0,03 nötral red ve *C. difficile* Selektif Supplement içeren BHI agar besiyerinde yayma plak yöntemi ile ekilen) üreyen koloni görüntüleri Şekil 5-7’de verilmiştir.

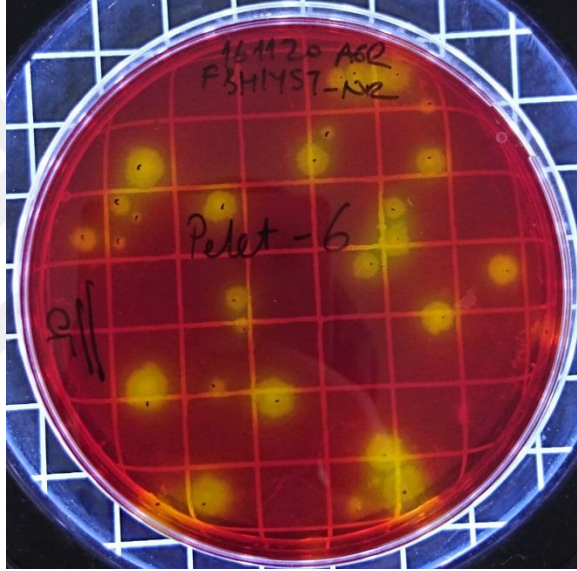


Şekil 5. *C. difficile* kolonilerinin BHI agarda (% 0.5 maya ekstratı içeren Brain Heart Infusion Agar) görüntüsü (A). Aynı besiyerinde kenarları dantela şeklinde ve şeffaf olan koloniler (B).

Brain Heart Infusion (BHI) agar bazlı petrielerde kenarları dantele şeklinde, şeffaf koloniler oluştuğu (Şekil 5), % 5 koyun kanlı agarda kolonilerin çevresinde hemoliz oluşmadığı (Şekil 6), nötral red ilave edilmiş besiyerinde kolonilerin sarı renkte olduğu (Şekil 7) gözlenmiştir.



Şekil 6. %5 Koyun Kanlı Agarda *C. difficile* kolonilerinin görüntüsü

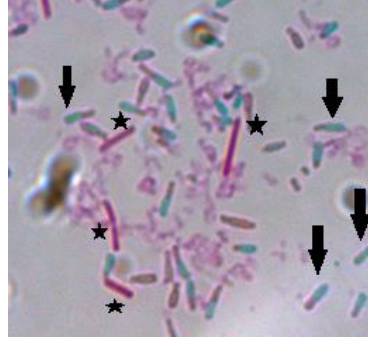


Şekil 7. FBHIYST-NR morfolojik görüntüsü (Fruktöz % 0,5 maya ekstratı, % 0,1 sodyum taurakolat, % 0,03 nötral red ve *C. difficile* Selektif Supplement içeren BHI agar) besiyerinde *C. difficile* kolonilerinin görünümü. pH değişimine bağlı olarak etrafı kırmızıdan sarıya dönüşen koloniler

4.1.2. Mikroorganizmaya İlişkin Doğrulama Sonuçları

4.1.2.1. Gram Boyama ve Sporlu Formların Boyanması

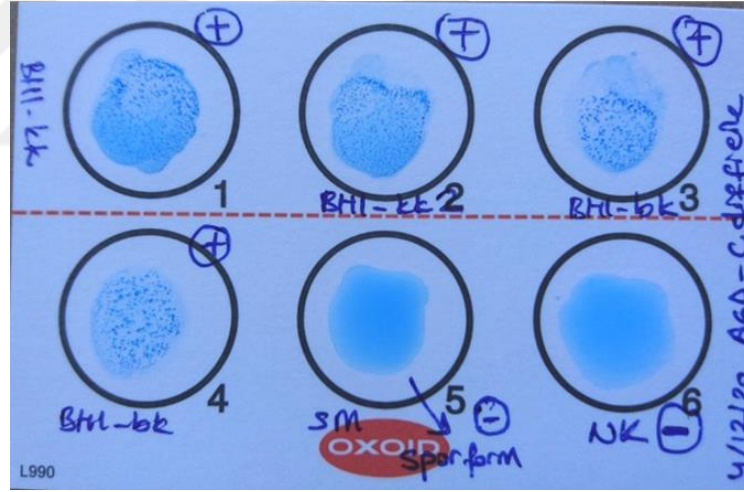
Gram boyama ile vejetatif hücreler gram (+) boyanmışlardır. Malaşit yeşili ile yapılan spor boyamasında vejetatif hücrelerin safranin ile pembe renkte, sporların ise yeşil renkte boyandığı gözlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Malaşit yeşili ile boyanmış *C. difficile* sporları (oklar) ve safranin ile boyanmış vejetatif hücreler (yıldız) (x100 büyütme)

4.1.2.2. Hızlı Test Kiti Sonuçları

Oxoid *C. difficile* test kiti sonuçları Şekil 9’da verilmiştir. Vejetatif hücreler belirgin şekilde aglutinasyon oluştururken, spor stok süspansiyonu ile yapılan reaksiyon negatif sonuç vermiştir.

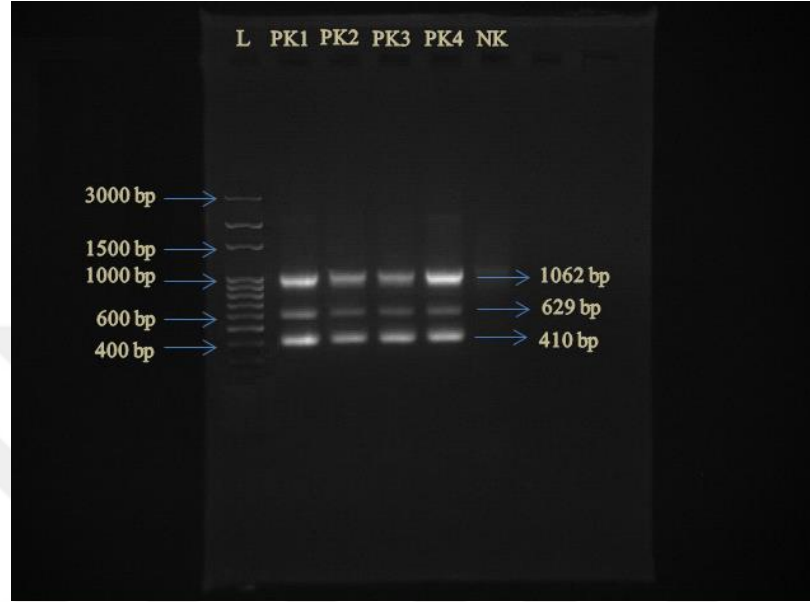


Şekil 9. *C. difficile* Test Kiti Sonuçları– 1, 2 ,3 ve 4 no’lu dairelerde petri üzerinden seçilen büyük ve küçük kolonilerin belirgin bir şekilde aglutinasyon oluşturduğu görülmektedir. 5 no’lu dairede stok süspansiyonundan hazırlanan spor formun ve 6 no’lu dairede negatif kontrolün aglutinasyon oluşturmadığı görülmektedir.

4.1.2.3. Mikroorganizmanın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Sekans Analizi ile Onaylanması

Çalışmada kullanılan referans bakteriyi genetik olarak tanımlamak amacıyla hem türe özgü spesifik primerler kullanarak PZR işlemi hem de 16S rDNA dizi analizi

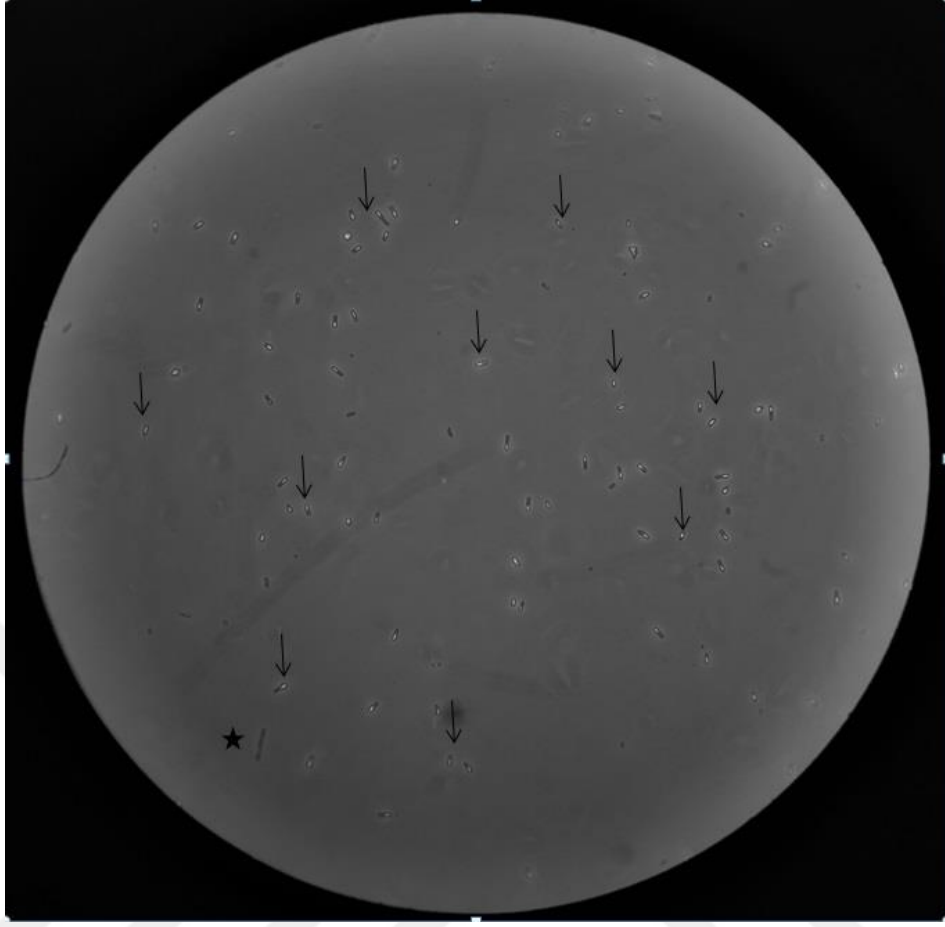
gerçekleştirildi. PZR sonuçlarına ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 10'da verilmiştir. Dizi analizi ile de çalışılan referans suşun *C. difficile* olduğu onaylanmıştır.



Şekil 10. Soldan sağa doğru 1-2-3-4 nolu hatlar referans bakteri suşu, 5 nolu hat negatif kontroldür. 1062 bp bandı 16S rDNA, 629 bp bandı alfa toksin ve 410 bp bandı beta toksin gen fragmanıdır.

4.2. Spor Yapılarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi, Spor Stok Süspansiyonu Sayım Sonuçları

Yapılan mikroskopik incelemede spor yapılarının basillerin terminal uçlarında olduğu, sporlanması tamamlanmış sporların oval, parlak olduğu, sporlanmamış vejetatif basillerin mat olduğu gözlemlendi (Şekil 11). Çalışmamızda kullanılan stok spor süspansiyonundaki mikroorganizma sayısı mikroskopik sayımla yaklaşık olarak 2×10^9 spor/ml olarak saptanırken, kültür yöntemiyle yapılan sayımda bu değer 1×10^9 spor/ml olarak belirlendi. Stok spor süspansiyonunda zamana bağlı olarak değişim olup olmayacağına yönelik yaptığımız testlerde $+4$ °C'de 1 ay boyunca bekletmede spor sayısında değişim olmadığı ve çimlenme etkinliğinde de değişiklik olmadığı (% 99) hesaplanmıştır.



Şekil 11. Hazırlanan spor stok süspansiyonunun Faz Kontrast mikroskop görüntüsü ve sporların yapısı (x100 büyütme). Sporlanmasını tamamlamış parlak ve oval sporlar (ok), sporlanmamış vejetatif hücre (yıldız).

4.3. Kullanılan Sütün Mikrobiyolojik ve Fiziko-kimyasal Özellikleri

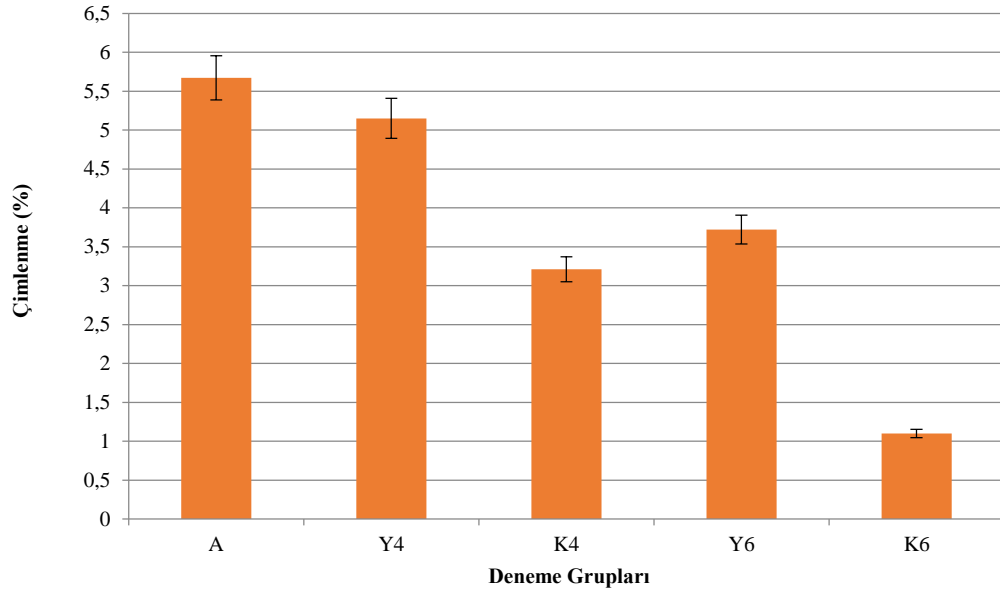
Çalışmada kullanılan çiğ inek sütünün mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal niteliklerine ilişkin veri Tablo 7’de verilmiştir. Mezofilik Aerobik Mikroorganizma sayısı Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ (2017/20) belirtilen kriterlere uygun olduğu tespit edilmiştir. Deneysel olarak test mikroorganizmasıyla inokülasyon öncesi *C. difficile* varlığı açısından da çiğ süt numunelerinde herhangi bir üremenin olmadığı gözlenmiştir. Kullanılan süte ilişkin yağ (%), yağsız kuru madde (%), protein oranı (%), laktoz (%), dansite, donma noktası, asitlik (SH) ve pH değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan Çiğ İnek Sütünün Mikrobiyolojik ve Fiziko-kimyasal Nitelikleri

Test Edilen Parametre	Değerler ve standart hataları
Mezofilik Aerobik Sayısı	4,95± 0,82
<i>C. difficile</i> Sayısı	Üreme yok (bulunamadı)
Yağ (%)	3,23 ±0,11
Yağsız Kuru Madde (%)	12,96 ±0,07
Protein (%)	4,56 ±0,06
Laktoz (%)	4,84 ±0,04
Yoğunluk	1,033 ±0,00010
Donma Noktası (%)	-0,81
Soxhelet-Henkel cinsinden asitlik derecesi (°SH)	8
pH	6,64 ± 0,07

4.4. *C. difficile* Sporlarının Çimlenme Etkinliğinin Belirlenmesi

Süt ve süt ürünlerine katılan sporların % kaçının çimlendiğinin tahmini maksadıyla etkenle kontamine edilmiş süttten prosesine uygun şekilde pastörize süt, kefir ve yoğurt numuneleri üretilmiş ve pastörize süt için 3. saat, yoğurt için 5. saat ve kefir için 18-24 saat sonunda 0. gün koloni sayımları yapılmış ve 0. gün sayımında sayılan koloni sayısı, inokulumun koloni sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak % spor çimlenme etkinliği hesaplanmıştır. Süre sonunda 10^6 spor/ml konsantrasyonunda *C. difficile* inoküle edilmiş pastörize süt grubunda (Şekil 12, A kolonu) etkenin % $5,67 \pm 3,49$ 'lik kısmının çimlenebildiği belirlenmiştir. Yoğurt ve kefir üretiminde kullanılan süt örneklerinde ise 10^4 ve 10^6 spor/ml konsantrasyonlarında 2 farklı inokülasyon yolu izlenmiştir. Uygulanan ısı işlem ve ürünlerin uygun koşullarda inkübasyonu sonucu 10^6 konsantrasyonunda inokülasyon yapılan yoğurt (Şekil 12, Y6 kolonu) ve kefir (Şekil 12, K6 kolonu) numunelerinde geri kazanım çimlenme oranları sırasıyla % $3,72 \pm 0,36$ ve % $1,01 \pm 0,858$ bulunurken, 10^4 seviyesinde ekim yapılan gruplarda yoğurt (Şekil 12, Y4 kolonu) ve kefir (Şekil 12, K4 kolonu) oranı sırasıyla % $5,15 \pm 2,45$ ve % $3,21 \pm 1,91$ olarak tespit edilmiştir. Süt ve ürünlerinden etkenin izolasyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda nispeten düşük oranlarda izole edilmesinin bir nedeni de çalışmamızda elde ettiğimiz bu verilerle açıklanabilir.



Şekil 12. *C. difficile* inoküle edilen süttten üretilen pastörize süt (A: 10^6 spor/mL), yoğurt (Y4: 10^4 spor/mL, Y6: 10^6 spor/mL) ve kefir (K4: 10^4 spor/mL, K6: 10^6 spor/mL) gruplarında üretim sonrası çimlenme yüzdeleri (muamele süresi: pastörize süt için 3 saat; yoğurt için 5 saat ve kefir için 18-24 saat)

Kefir ve yoğurt gruplarında depolama sürecindeki çimlenme yüzdeleri Tablo 8’de verilmiştir. Depolama süresince ortalama çimlenme yüzdesi Y4 grubunda $3,30 \pm 1,80$; K4 grubunda $2,85 \pm 0,30$; Y6 grubunda $1,94 \pm 0,29$ ve K6 grubunda $1,32 \pm 0,29$ bulunmuştur. Gruplar arası ortalama çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında Y4 ($\bar{x}=3,30 \pm 1,08$)-K4 ($\bar{x}=2,85 \pm 0,30$) ve Y6 ($\bar{x}=1,94 \pm 0,29$)-K6 ($\bar{x}=1,32 \pm 0,29$) arasında fark yoktur ($p > 0,05$). Y4 grubu; K6 ($p < 0,001$) ve Y6 ($p = 0,010$) gruplarından farklı; K4 grubu, K6 grubundan farklıdır ($p = 0,003$). K4 ile Y6 arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p > 0,05$).

Tablo 8. Yoğurt ve Kefir gruplarında depolama süresince çimlenme yüzdeleri

Analiz Günleri	Gruplar			
	(Çimlenme % ± Standart Sapma)			
	Y4 ^z	K4 ^z	Y6 ^z	K6 ^z
0 ^x	5.15 ± 2.45 ^{aAA}	3.21 ± 1.91 ^{aAB}	3.72 ± 0.36 ^{aAB}	1.10 ± 0.858 ^{aBB}
5	10.25 ± 0.25 ^{bAA}	2.94 ± 0.82 ^{aBB}	1.94 ± 0.95 ^{aBB}	0.70 ± 0.56 ^{aBB}
10	0.35 ± 0.15 ^{cAA}	1.94 ± 0.74 ^{aAA}	1.21 ± 0.19 ^{aAA}	1.81 ± 1.45 ^{aAA}
15	0.23 ± 0.23 ^{cAA}	2.97 ± 1.00 ^{aAA}	1.89 ± 0.85 ^{aAA}	1.43 ± 1.97 ^{aAA}
20	0.54 ± 0.39 ^{cAA}	3.20 ± 1.56 ^{aAA}	0.94 ± 0.31 ^{aAA}	1.53 ± 0.815 ^{aAA}
Ortalama	3.30 ± 1.08 ^{AA}	2.85 ± 0.30 ^{AA}	1.94 ± 0.29 ^{AA}	1.32 ± 0.29 ^{BB}

^x: Fermentasyon bitimi yoğurt numuneleri için 5. Saat; kefir numuneleri için 18-24. saat

^z: birbirinden bağımsız 3 tekrarın ortalaması

Aynı grubun içindeki değişik günler arasındaki istatistiksel farklılık değişik küçük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

Aynı analiz günündeki farklı gruplar arasındaki istatistiksel farklılık değişik büyük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

Gruplar; Y4: 10⁴ spor/ml, Y6: 10⁶ spor/ml dozda etken içeren yoğurt örnekleri ve K4: 10⁴ spor/ml, K6: 10⁶ spor/ml dozda etken içeren kefir örnekleridir.

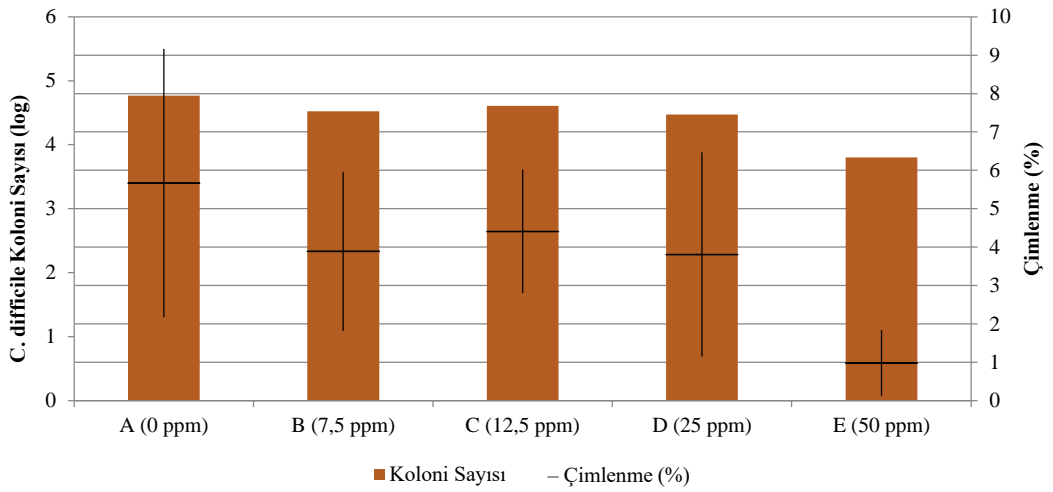
Y4 grubunda fermentasyon bitimi çimlenme yüzdesi ile 5. Gün (p<0,001), 10. gün (p<0,001), 15. gün (p<0,001) ve 20. gün (p=0,001) çimlenme yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,01). 10. gün -15. gün ve 15. gün - 20. günler arasında istatistiksel olarak fark yoktur. 5. günde çimlenme yüzdesindeki artış dikkat çekmektedir.

K4, K6 ve Y6 gruplarında fermentasyon bitimi çimlenme yüzdesi ile diğer tüm analiz günlerindeki çimlenme yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=1,000).

Farklı yoğurt ve kefir grupları arasındaki çimlenme yüzdeleri fermentasyon bitiminde karşılaştırıldığında Y4 (\bar{x} =5,15±2,45), K4 (\bar{x} =3,21±1,91) ve Y6 (\bar{x} =3,72±0,36) grupları arasında istatistiksel olarak fark yoktur. Y4 grubu K6 (\bar{x} =1,10±0,858) grubundan farklıdır. 5. günde Y4 (\bar{x} =10,25±0,25) grubu tüm gruplardan farklıdır (p<0,001) ve diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur (p>0,05). 10. gün, 15. gün, ve 20. günlerde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p>0,05).

4.5. Nisinin İçeren Pastörize Sütte *C. difficile*'nin Çimlenme Etkinliği

Laktik asit bakteri içerisinde önemli bir yere sahip olan laktokok bakterilerince üretilen ve gıdalarda koruyucu olarak kullanım izni olan bir bakteriyosin olan nisinin çimlenme etkinliği ve spor canlılığı üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla içerisinde 10^6 konsantrasyonunda *C. difficile* sporu bulunan pastörize süt deneme gruplarına (B, C, D, E) ayrıldı ve içine oda sıcaklığında farklı dozlarda nisin ilave edildi. Son 1 saati nisin ile birlikte olmak üzere toplam 3 saat süt ortamına maruz kalmış sporların çimlenme etkinliği sayılan koloni sayısının, inokulumun koloni sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla belirlendi. Nisin ilave edilmeyen kontrol grubunda (A) çimlenme etkinliği ortalama % $5,67 \pm 3,49$ oranında bulunurken, 7,5 ppm konsantrasyonunda nisin ilave edilen grupta (B) % $3,89 \pm 2,07$; 12,5 ppm ilave edilen grupta (C) % $4,41 \pm 1,61$; 25 ppm ilave edilen grupta (D) % $3,81 \pm 2,66$ ve 50 ppm ilave edilen grupta (E) % $0,98 \pm 0,857$ olarak belirlenmiştir (Şekil 13). 50 ppm seviyesinde ilave edilen nisinin diğer inokülasyon seviyelerine nazaran daha yüksek seviyede etkinliğinin olduğu ancak sporların tamamını yok etmeye yeterli olmadığı gözlemlendi. Çalışmamızda elde edilen bu sonuç deneysel koşullarda nisinin belirli bir etkinliğinin olabileceğini ancak güncel hayatta maliyet ve uygulanabilirlik hesabı yapıldığında, 50 ppm seviyelerinde nisin uygulamasının rantabilite açısından uygun olmayacağını göstermektedir.



Şekil 13. Pastörize Süt Deneme Gruplarında Nisinin Çimlenmeye ve *C. difficile* Sayısına Etkisi (Muamele süresi: A grubu için 3 saat süt ortamı; B,C,D ve E grubu için son 1 saati nisin ile birlikte olmak üzere toplam 3 saat süt ortamı)

4.6. Pastörize Sütün Depolanması Esnasında *C. difficile* Sporlarının Canlılığı, Davranışı ve Nisinin Etkisi

Genel olarak pastörizasyon işlemi patojen mikroorganizmaların vejetatif formlarının tamamını yıkımlamak üzere uygulanmaktadır. Bununla birlikte spor oluşturan bakterilerin spor formları daha dayanıklı olduklarından uygulanan ısı derecesinde yıkımlanmamaktadır. Çalışmamızda *C. difficile* sporlarının pastörize sütte ne kadar süreyle canlı kalabildiğini belirlemek amacıyla, süte farklı konsantrasyonlarda mikroorganizma inokülasyonu ile nisin ilavesi yapıldı. A grubu spor inoküle edilen ancak nisin (0 ppm) ilave edilmeyen grup iken, diğer gruplara (B-7,5 ppm; C-12,5 ppm; D 25 ppm ve E; 50 ppm) nisin ile spor inokülasyonu yapıldı ve 4 °C'de 20 gün boyunca bekletildi. Farklı zaman aralıklarında mikroorganizma sayısındaki değişiklikler izlendi.

Pastörize sütte *C. difficile* sayım sonuçları Tablo 9 (A kolonu)'da ve Şekil 14(A)'da gösterilmiştir. Çalışmamızda 10^6 spor/mL dozunda *C. difficile* sporları inoküle edilerek üretilen pastörize inek sütünde sporların canlılıklarını +4 °C'de 20 günlük depolama boyunca sürdürdüğü görülmüştür. Üretimin ilk günü ile depolamanın son günü arasındaki azalış miktarı 0,55 log olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Bu süreçte pH değeri en düşük 10. günde $6,64 \pm 0,07$ olarak ve en yüksek 5. günde $6,72 \pm 0,05$ olarak ölçülmüştür. Titrasyon Asitliği (SH) değeri 0. ve 5. günde en düşük $7,33 \pm 0,432$ ve 20. günde en yüksek $8,66 \pm 0,864$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 9. Pastörize Süt Kontrol ve Nisin Deneme Gruplarının Depolanması Esnasında *C. difficile* Sporlarının Canlılığı

Analiz Günleri	Gruplar (Ortalama ± Standart Sapma)				
	A ^y	B ^y	C ^y	D ^z	E ^z
0 ^x	4,77 ± 0,1939 ^{aA}	4,52 ± 0,2780 ^{aA}	4,61 ± 0,1784 ^{aA}	4,47 ± 0,3522 ^{aA}	3,80 ± 0,3005 ^{aB}
5	4,70 ± 0,3059 ^{aA}	4,42 ± 0,1040 ^{aA}	4,34 ± 0,1355 ^{aA}	3,81 ± 0,1184 ^{bB}	3,60 ± 0,2040 ^{aB}
10	4,48 ± 0,048 ^{aA}	4,29 ± 0,1571 ^{aA}	4,19 ± 0,1182 ^{aA}	3,40 ± 0,0283 ^{bB}	3,04 ± 0,0100 ^{bB}
15	4,36 ± 0,0982 ^{bA}	4,44 ± 0,1540 ^{aA}	4,21 ± 0,2051 ^{bA}	3,59 ± 0,0881 ^{bB}	2,28 ± 0,1625 ^{cC}
20	4,30 ± 0,1484 ^{bA}	4,31 ± 0,1226 ^{aA}	4,01 ± 0,2311 ^{bA}	2,78 ± 0,0000 ^{cB}	2,23 ± 0,0532 ^{cC}
Ortalama	4,54±0,25^A	4,41±0,19^{AB}	4,31±0,25^B	3,63±0,61^C	2,99±0,71^D

^x: Pastörizasyon sonrası soğutulan sütlerden 3. saatte numune alınmıştır

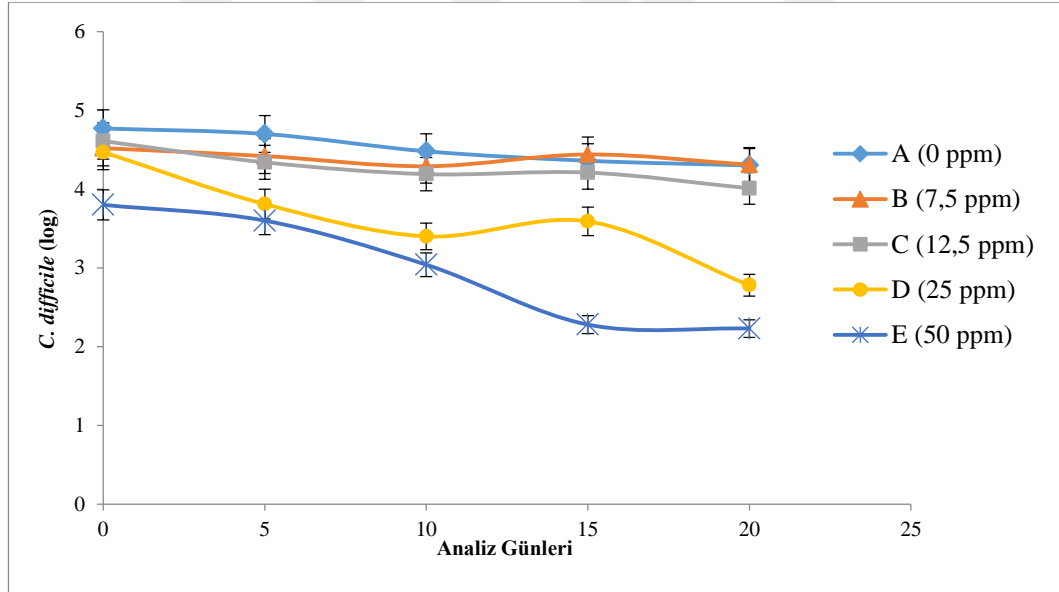
^y: birbirinden bağımsız 7 tekrarın ortalaması

^z: birbirinden bağımsız 4 tekrarın ortalaması

Aynı grubun içindeki değişik günler arasındaki istatistiksel farklılık değişik küçük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

Aynı analiz günündeki farklı gruplar arasındaki istatistiksel farklılık değişik büyük harflerle gösterilmiştir (p<0,05).

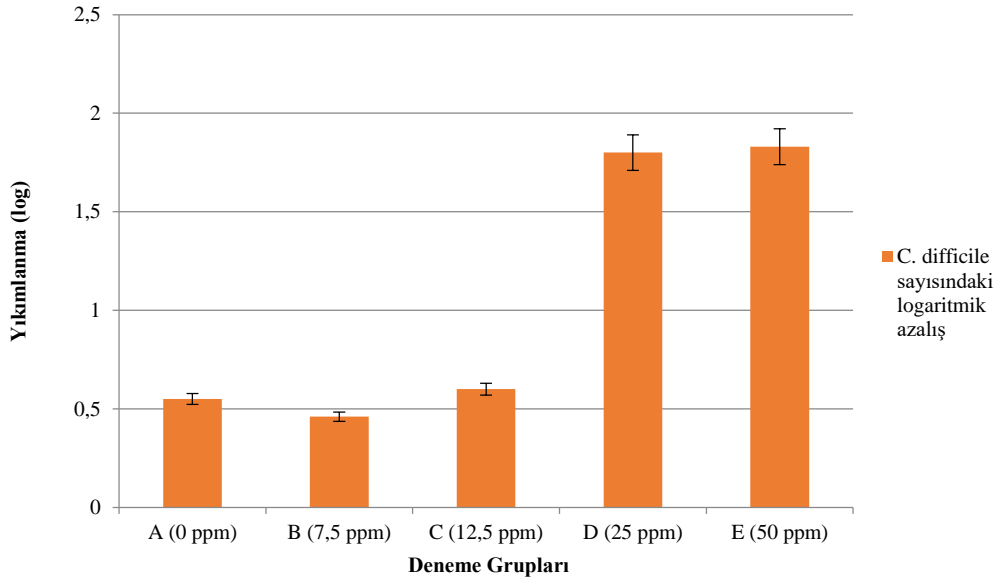
A:0 ppm; B:7,5 ppm; C:12,5 ppm; D:25 ppm ve E: 50 ppm nisin ilave edilen pastörizasyon süt grubunu göstermektedir.



Şekil 14. Pastörize Süt Kontrol ve Deneme Gruplarında *C. difficile* sayısının değişimi

Çalışmamızda 10^6 spor/mL dozunda *C. difficile* sporu katılmış inek sütünden farklı dozlarda nisin (A-0; B-7,5 ppm; C-12,5 ppm; D 25 ppm ve E; 50 ppm) ilave edilerek üretilen pastörize sütlerin depolama süresince canlılığı incelendiğinde nisinün süt ortamında *C. difficile* sporları üzerine sınırlı inhibisyon etkisi olduğu en yüksek kullanıldığı konsantrasyonda bile sporların tamamıyla inaktive olmadığı

gözlenmiştir. Bununla birlikte 20 günün sonunda en yüksek yıkımlanmanın 25 ve 50 ppm konsantrasyonlarında gerçekleştiği saptanmıştır. *C. difficile* sayısındaki logaritmik azalış, üretimin ilk günü ile depolamanın son günü arasında B, C, D ve E gruplarında sırayla 0,46; 0,60; 1,80 ve 1,83 log kob/ml olarak bulunmuştur (Şekil 15).



Şekil 15. Pastörize sütün + 4 °C'de depolama süresince *C. difficile*'nin farklı konsantrasyondaki nisin ile yıkımlanması (A-0 ppm; B-7,5 ppm; C-12,5 ppm; D 25 ppm ve E; 50 ppm)

Depolama süresi boyunca grupların kendi içlerinde *C. difficile* sayısındaki değişim değerlendirildiğinde (Tablo 9 ve Şekil 14); A grubunda depolamanın ilk günü (0. gün) ile 5. ve 10. günleri arasında fark bulunmamıştır ($p=1,000$). Ancak depolamanın 15. ($p=0,017$) ve 20. günlerinde ($p=0,024$) 0. güne göre anlamlı fark bulunmuştur. 15. ve 20. gün arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=1,000$).

B deneme grubunda, depolamanın başlangıç ve son günleri arasında mikroorganizmanın sayısal değişimi hakkında herhangi fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

C grubunda depolamanın ilk günü ile 5. ve 10. günleri arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak depolamanın 15 ve 20. günlerinde ilk güne göre anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). 15. ve 20. gün arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=1,000$).

D grubunda üretimin ilk günü ile depolamanın 5.-10.-15. ve 20. günü arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p<0,001$). 5. 10 ve 15. günlerinin kendi

aralarında kıyaslanmasında fark bulunmazken ($p>0,05$); 10. gün ile 20. gün arasında fark bulunamamıştır ($p=0,051$) ve 15. gün ile 20. gün arasında fark bulunmuştur ($p<0,001$).

E grubunda üretimin ilk günü ile 5. gün arasında fark bulunmazken ($p=1,000$); 10.-15. ve 20. günü arasında fark bulunmuştur ($p<0,001$). 10. gün ile 15. ve 20. gün arasında fark bulunmuştur($p<0,001$). 15. gün ile 20. gün arasında fark bulunmamıştır ($p=1,000$).

Analiz gününün etkisi göz ardı edilerek gruplarda *C. difficile* canlılığı değerlendirildiğinde A grubunda *C. difficile* sayısı ortalama $4,54\pm 0,25$; B grubunda $4,41\pm 0,19$; C grubunda $4,31\pm 0,25$; D grubunda $3,63\pm 0,61$ ve E grubunda $2,99\pm 0,71$ olarak bulunmuştur (Tablo 9). Ortalama koloni sayılarına göre gruplar arasındaki fark değerlendirildiğinde A grubu ile B grubu arasında ($p=0,102$) ve B ile C grubu arasında ($p=0,105$) istatistiksel olarak fark yoktur. A grubu ile C grubu ($p<0,001$), D grubu ($p<0,001$) ile E grubundan ($p<0,001$) istatistiksel olarak farklıdır ve bu gruplar kendi aralarında da birbirinden farklıdır ($p<0,001$).

Analiz gününün etkisi dahil edilerek gruplar arasındaki farklılık ANOVA ve PostHoc Bonferroni Testi ile incelendiğinde pastörize süt üretiminden hemen sonra yapılan 0. gün sayımlarında gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. *C. difficile* sayısı en yüksek A grubunda ve en düşük E grubunda bulunmuştur. A grubu ile B, C ve D grupları arasında fark bulunmazken ($p=1,000$); E grubu arasında istatistiksel olarak fark olduğu ($p<0,001$) bulunmuştur. B grubu ile C ve D gruplarının arasında fark olmadığı ($p=1,000$); C grubu ile D grubu arasında fark olmadığı ($p=1,000$) ve D grubu ile E grubu arasında fark olduğu ($p<0,001$) bulunmuştur.

Analizlerin 5. günde A grubu, B ($p=1,000$) ve C grubu ($p=0,104$) arasında fark bulunmazken; A, B ve C grubu ile D ve E grubu arasında anlamlı fark vardır ($p<0,01$). D ve E grubu arasında fark yoktur ($p=1,000$).

Analizlerin 10. günde A grubu, B ($p=1,000$) ve C grubu ($p=1,000$) arasında fark bulunmazken; A, B ve C grubu ile D ve E grubu arasında anlamlı fark vardır ($p<0,001$). D ve E grubu arasında fark yoktur ($p=1,000$).

Analizlerin 15. günde A grubu, B (p=1,000) ve C grubu (p=1,000) arasında fark bulunmazken; A, B ve C grubu ile D ve E grubu arasında anlamlı fark vardır (p<0,001). D ve E grubu arasında fark vardır (p<0,001).

Analizlerin 20. günde A grubu, B (p=1,000) ve C grubu (p=1,000) arasında fark bulunmazken; A, B ve C grubu ile D ve E grubu arasında anlamlı fark vardır (p<0,001). D ve E grubu arasında fark vardır (p=0,005).

Özetle A, B ve C grupları 20 günlük depolamada süresi boyunca benzer davranırken; D ve E grupları 0.-5. ve 10. günler benzer davranıp 15. ve 20. günde farklı davranmışlardır.

4.7. Kefirde Etkenin İzlenmesi

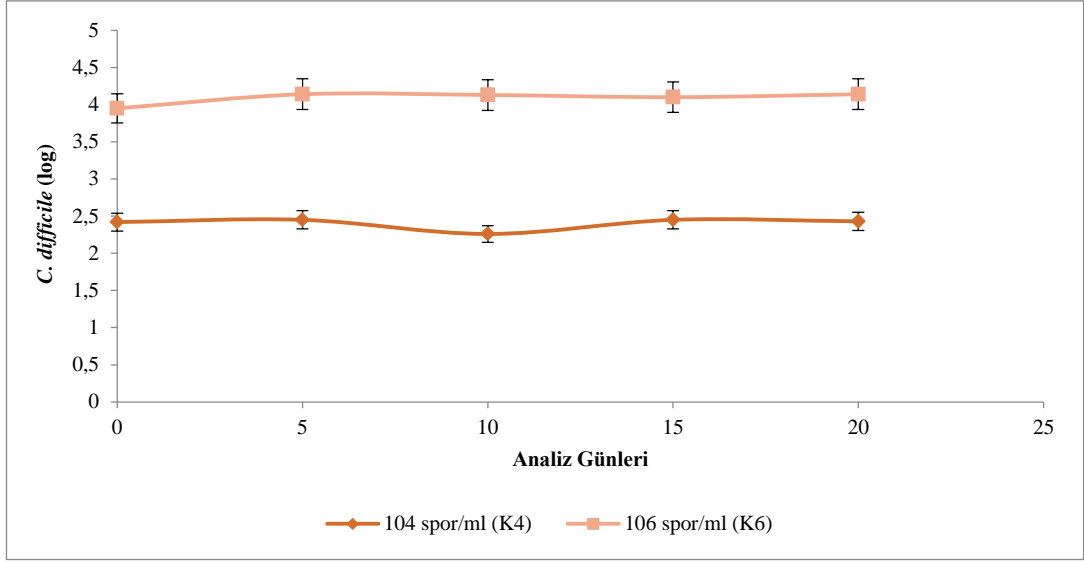
4.7.1. Kefirde *C. difficile* Sporlarının Canlılığı

Kefirin depolanması süresince etkenin canlılığı ve davranışını izlemek amacıyla yaklaşık olarak 10^4 (K4) ve 10^6 spor/ml (K6) dozlarındaki iki farklı konsantrasyondaki mikroorganizma ısıl işlem öncesi süte ilave edilmiştir. *C. difficile* sporlarının üretim ve sonrasında 20 günlük +4 °C de canlılığı Tablo 10'da ve Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Kefirin Depolanması Esnasında *C. difficile* Sporlarının Canlılığı

Analiz zamanı (gün)	<i>C. difficile</i> spor inokülasyonu	
	10^4 spor/ml (K4)	10^6 spor/ml (K6)
0 ^x	2,42±0,36	3,95±0,32
5	2,45±0,13	4,14±0,34
10	2,26±0,15	4,13±0,35
15	2,45±0,15	4,10±0,43
20	2,43±0,12	4,14±0,21

^x: fermantasyon bitiminde



Şekil 16. Kefirin Depolanması esnasında *C. difficile* Sporlarının Canlılığı

Her iki konsantrasyon grubunda da etkenin canlılığını 20. güne kadar sayısal olarak belirgin bir değişiklik olmaksızın koruduğu görülmektedir. Hem K4 hem K6 grubunda, grup içi olarak analiz günleri arasında *C. difficile* sayısı bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Hem K4 hem de K6 grupları arasında *C. difficile* sayısı bakımından istatistiksel olarak fark saptanmıştır ($p<0,05$). *C. difficile* sayısında analiz gününün etkisi önemsiz olarak bulunmuştur ($p>0,05$). Grup ve analiz günü etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde farkın önemli olmadığı bulunmuştur.

4.7.2. Kefir Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

K4 grubunda analiz günleri arasında laktobasil (MRS), maya ve TAMB sayısı bakımından fark olmadığı, ancak laktokok/streptokok (M17) sayısı bakımında fark olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Laktokok/streptokok sayısındaki farklılığın analiz günleri arasındaki ikili karşılaştırmada önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$)(Tablo 11, Şekil 17, 18, 19).

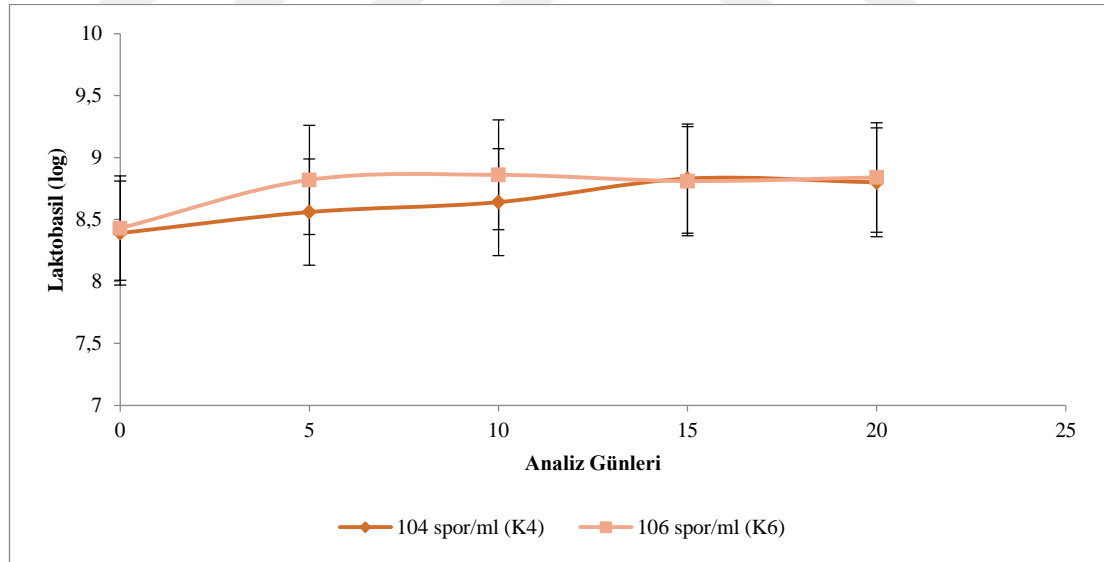
K6 grubunda analiz günleri arasında laktobasil, laktokok/streptokok, maya ve TAMB sayısı bakımından fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

K4 ve K6 grupları arasında depolama süresi boyunca toplam mezofilik aerob mikroorganizma, laktobasil ile laktokok/streptokok sayısı bakımından istatistiki fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

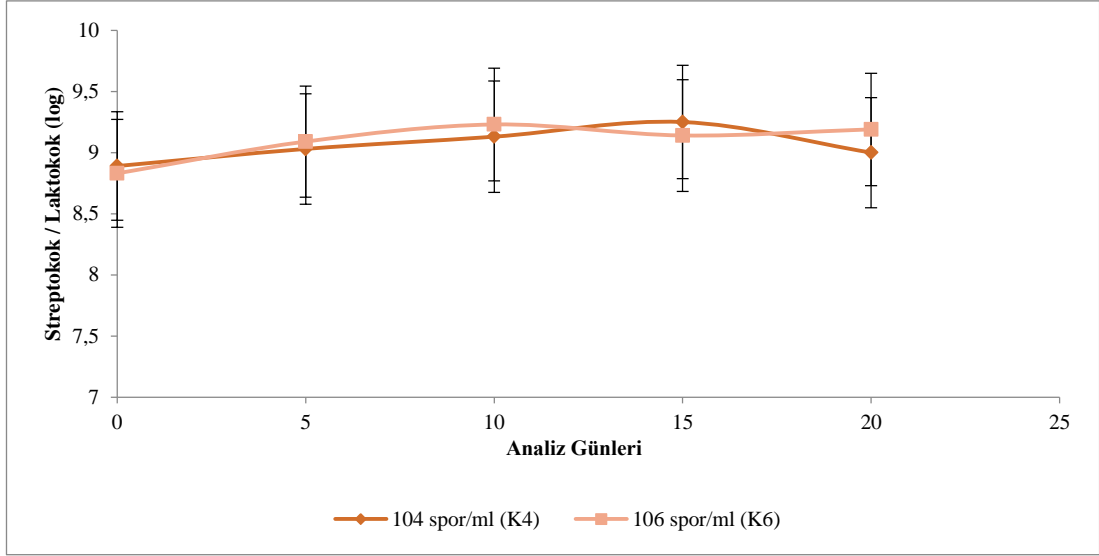
Tablo 11. K4 ve K6 gruplarında depolama sürecinde laktik asit bakterileri, maya ve TAMB sayılarının değişimi

Grup	Analiz				
	Zamanı (Gün)	Laktobasil	Streptokok/ laktokok	Maya	Toplam Mezofilik aerobik
K4	0 ^x	8,39±0,20	8,89±0,19	5,51±0,12	8,47±0,17
	5	8,56±0,12	9,03±0,10	5,30±0,18	8,62±0,10
	10	8,64±0,20	9,13±0,08	5,74±0,43	8,82±0,12
	15	8,83±0,21	9,25±0,05	5,98±0,40	8,98±0,21
	20	8,80±0,24	9,00±0,04	6,32±0,52	8,81±0,21
K6	0 ^x	8,43±0,39	8,83±0,56	5,26±0,14	8,77±0,24
	5	8,82±0,35	9,09±0,14	4,82±0,61	8,73±0,41
	10	8,86±0,43	9,23±0,07	5,82±0,27	8,93±0,36
	15	8,81±0,32	9,14±0,32	5,87±0,25	8,90±0,52
	20	8,84±0,26	9,19±0,14	6,28±0,45	9,13±0,38

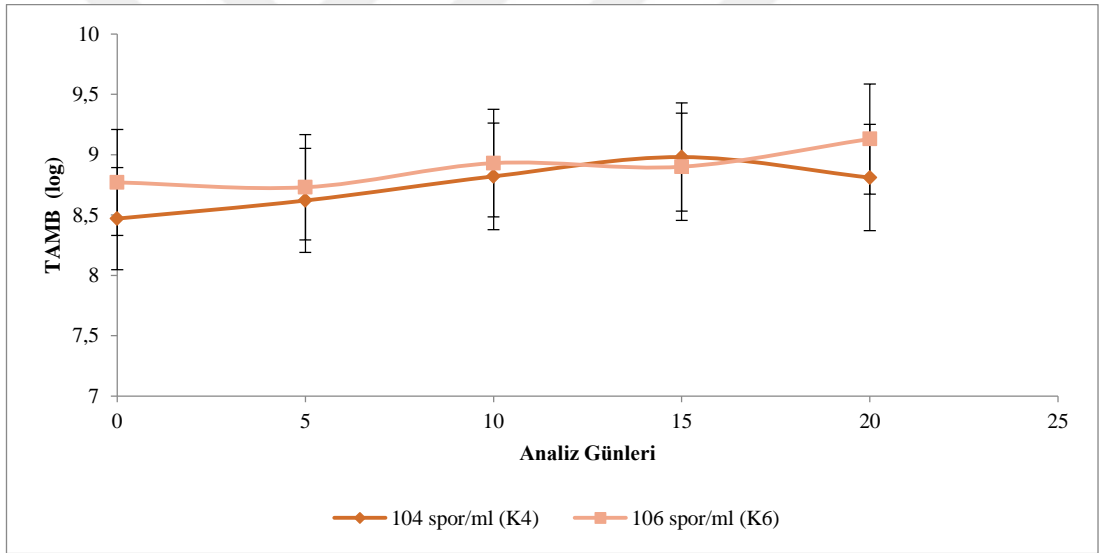
^x: fermantasyon bitiminde ölçüm yapılmıştır



Şekil 17. K4 ve K6 gruplarında depolama sürecinde laktobasil sayılarının değişimi



Şekil 18. K4 ve K6 gruplarında depolama sürecinde streptokok/laktokok sayılarının değişimi



Şekil 19. K4 ve K6 gruplarında depolama sürecinde TAMB sayılarının değişimi

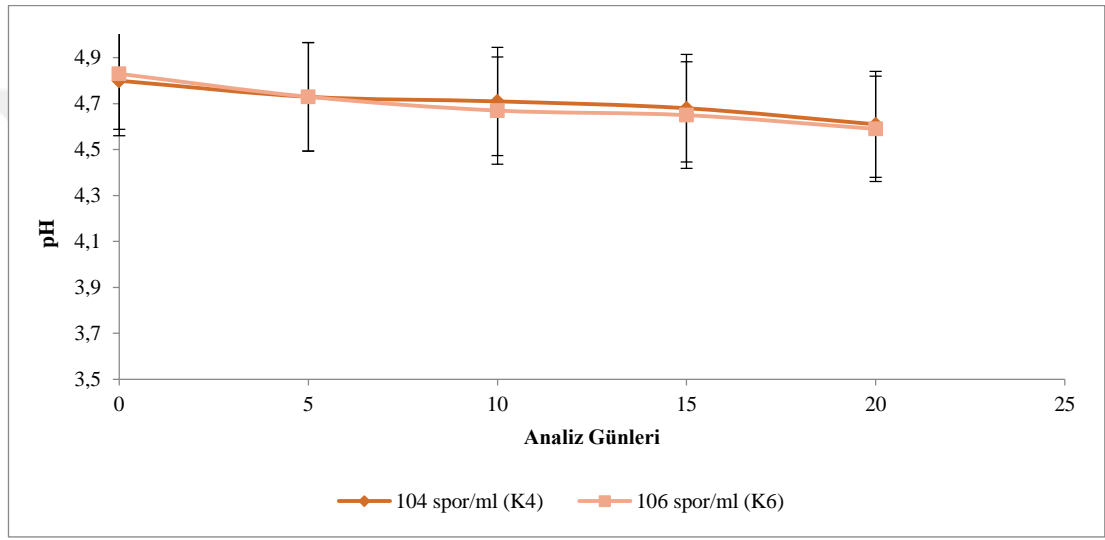
4.7.3. pH ve Titrasyon Asitliği Sonuçları

Üretilen kefir örneklerinin pH ve asitlik değişimleri 1. günden itibaren 20. güne kadar takip edilmiştir. Depolama sürecine bağlı olarak pH'nın gruplarda yaklaşık olarak 4,8 değerinden 4,6 değerine kadar düştüğü (Tablo 12, Şekil 20) titrasyon asitliğinin de yaklaşık olarak % 0,6 değerinden 0,8 değerine kadar arttığı gözlemlendi (Şekil 21).

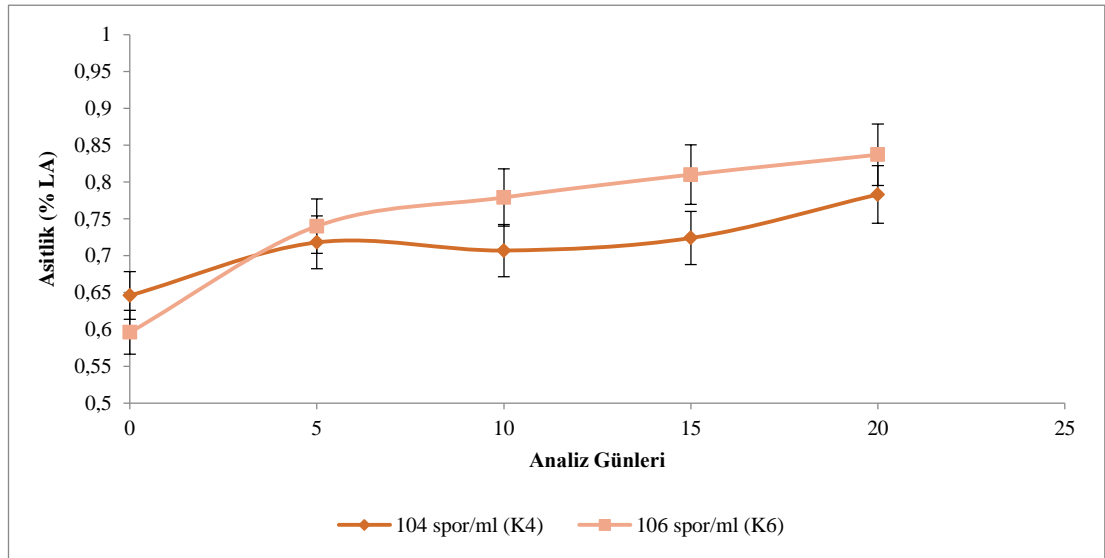
Tablo 12. Depolama süresince kefirde pH ve asitlik (% LA) değişimi

<i>C. difficile</i> spor inokülasyonu				
Zaman (gün)	10 ⁴ spor/ml (K4)		10 ⁶ spor/ml (K6)	
	pH	Asitlik (% LA)	pH	Asitlik (% LA)
0 ^x	4,80±0,01	0,646±0,028	4,83±0,05	0,596±0,017
5	4,73±0,06	0,718±0,064	4,73±0,17	0,740±0,053
10	4,71±0,08	0,707±0,104	4,67±0,20	0,779±0,017
15	4,68±0,07	0,724±0,046	4,65±0,19	0,810±0,001
20	4,61±0,14	0,783±0,038	4,59±0,17	0,837±0,012

^x fermantasyon sonu ölçümü



Şekil 20. Depolama süresince kefirde pH değişimi



Şekil 21. Depolama süresince kefirde asitlik (% LA) değişimi

Her iki grupta da grubunda analiz günleri arasında pH ve titrasyon asitliği bakımından belirgin fark bulunmamıştır. Yine test edilen gruplar arasında depolama süresi boyunca pH ve titrasyon asitliği değeri bakımından fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.8. Yoğurtta Etkenin İzlenmesi

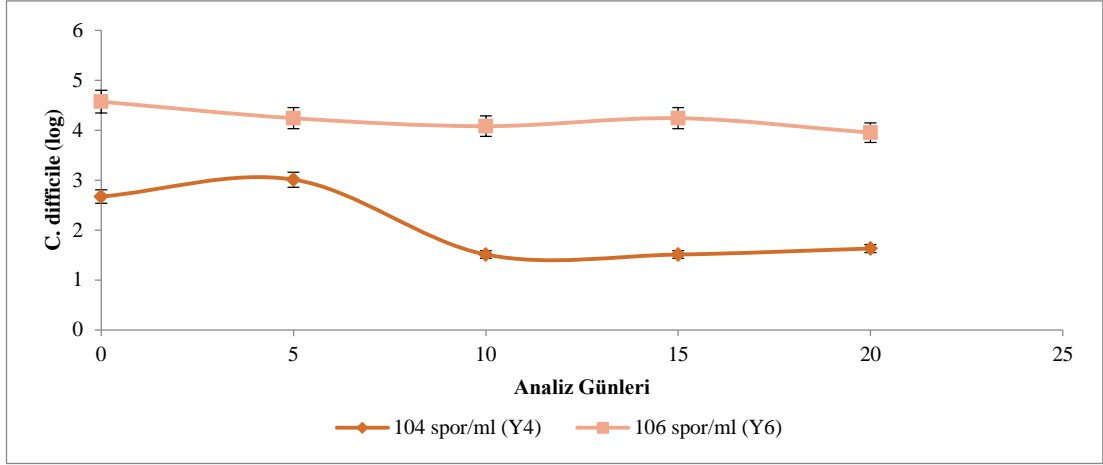
4.8.1. Yoğurtta *C. difficile* Sporlarının Canlılığı ve Davranışı

Yoğurdun üretim ve depolanması süresince etkenin canlılığı ve davranışını izlemek amacıyla yaklaşık olarak 10^4 spor/ml (Y4) ve 10^6 spor/ml (Y6) dozlarındaki iki farklı konsantrasyondaki mikroorganizma ısıl işlem öncesi süte ilave edilmiştir. Fermantasyon sonrasında (4-6. saatte) ilk numuneler inoküle edilen etken mikroorganizma analizi için alınmıştır. *C. difficile* sporlarının üretim ve sonrasında 20 günlük +4 °C deki raf ömrü esnasındaki canlılığı ve davranışı Tablo 13'te ve Şekil 22'de gösterilmiştir.

Tablo 13. Yoğurdun depolanması süresince *C. difficile* sporlarının canlılığı

Analiz zamanı (Gün)	<i>C. difficile</i> spor İnokülasyonu	
	10^4 spor/ml (Y4)	10^6 spor/ml (Y6)
0 ^x	2,67±0,227	4,57±0,0451
5	3,01±0,0100	4,24±0,237
10	1,51±0,197	4,08±0,0651
15	1,51±0,212	4,24±0,212
20	1,63±0,405	3,95±0,146

^x fermantasyon sonu ölçümü



Şekil 22. Yoğurdun depolanması süresince *C. difficile* sporlarının canlılığı

Y4 inokülasyon grubunda ölçülen 6. Saatteki mikroorganizma konsantrasyonu 2,67 log seviyesinden 10. günde 1,51 log konsantrasyonuna kadar düşmüş, 15. ve 20. günde düşme yönünde değişiklik gözlenmemiştir. Y4 grubunda analiz günleri arasında *C. difficile* sayısı bakımından fark olduğu bulunmuştur ($p=0,032$), ancak ikili karşılaştırmalarda günler arasında farklılık önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Y6 inokülasyon grubunda ölçülen 6. saatteki mikroorganizma konsantrasyonu 4,57 log seviyesinden 20. günde 3,95 log konsantrasyonuna kadar düşme yönünde değişiklik gözlenmiştir. Bu grupta da analiz günleri arasında *C. difficile* sayısı bakımından fark olduğu bulunmuştur ($p=0,032$), ancak ikili karşılaştırmalarda günler arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Y4 ve Y6 gruplarının karşılaştırılmasında *C. difficile* sayısı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p>0,05$).

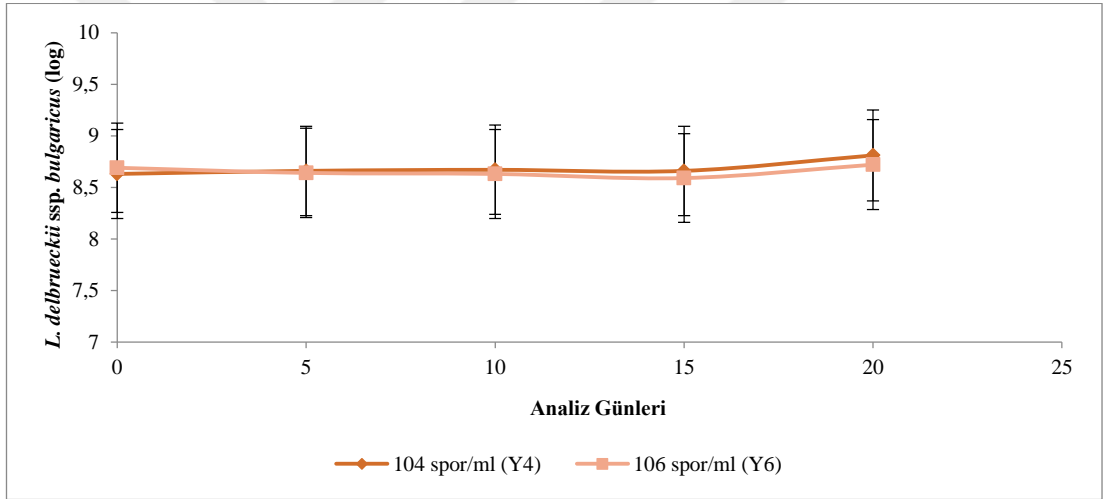
4.8.2. Yoğurdun Mikrobiyolojik Analizleri

Üretilen yoğurt numunelerinde *C. difficile*'ye ilaveten starter kültür olarak katılan mikroorganizmaların sayısal değişiminin de belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sayısı MRS besi yerinde, *S. thermophilus* sayısı ise M17 besiyerinde izlenmiştir. Ayrıca 37 °C'de üreyen mezofil mikroorganizma sayısı da PCA besiyerinde izlenmiştir (Tablo 14). Elde edilen verilerin grafik halinde gösterimi Şekil 23, 24 ve 25'te verilmiştir.

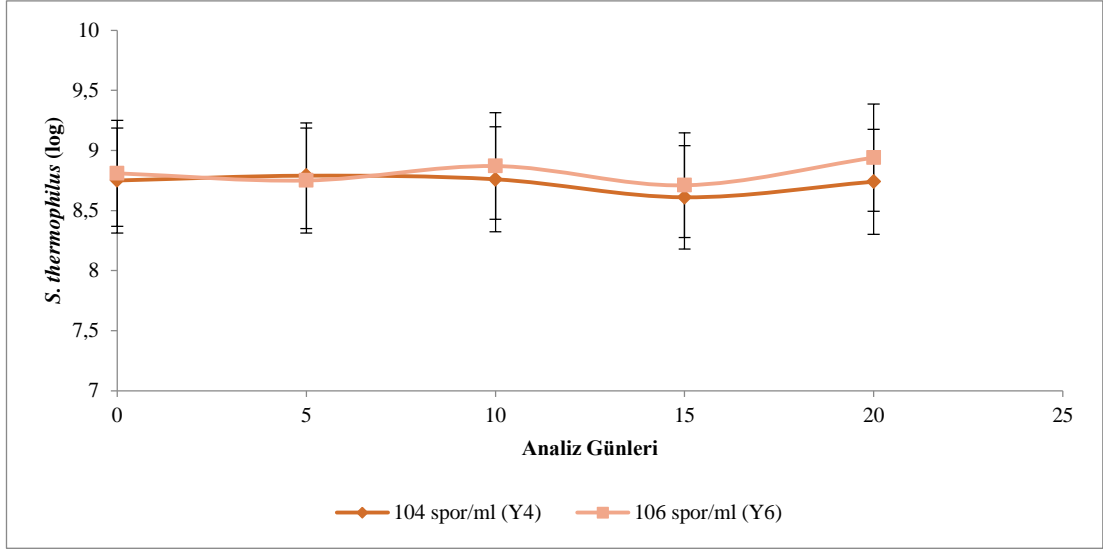
Tablo 14. Yoğurt numunelerinde starter kültür olarak katılan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayısı ile TAMB sayısının zamana bağlı değişimi

	Analiz (gün)	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>	Toplam Mezofilik Aerob
Y4	0 ^x	8,63±0,428	8,75±0,110	8,58±0,282
	5	8,66±0,150	8,79±0,0208	8,68±0,149
	10	8,67±0,195	8,76±0,0503	8,73±0,137
	15	8,66±0,159	8,61±0,150	8,71±0,0100
	20	8,81±0,0577	8,74±0,194	8,84±0,0802
Y6	0 ^x	8,69±0,197	8,81±0,117	8,51±0,441
	5	8,64±0,277	8,75±0,0551	8,64±0,0379
	10	8,63±0,172	8,87±0,131	8,73±0,125
	15	8,59±0,0945	8,71±0,0603	8,55±0,223
	20	8,72±0,212	8,94±0,237	8,94±0,165

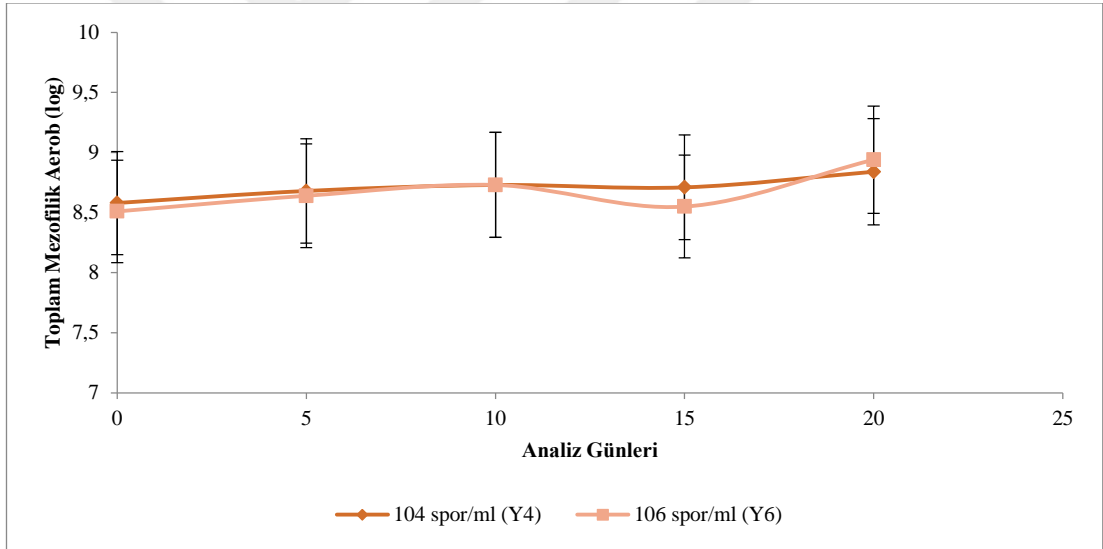
^x: fermantasyon sonrası ölçüm



Şekil 23. Yoğurt numunelerinde starter kültür olarak katılan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sayısının zamana bağlı değişimi



Şekil 24. Yoğurt numunelerinde starter kültür olarak katılan *S. thermophilus* sayısının zamana bağlı değişimi



Şekil 25. Yoğurt numunelerinde toplam mezofilik aerob sayısının zamana bağlı değişimi

Hem Y4 hem de Y6 gruplarında TAMB sayısı, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayılarının değişimi depolama günlerine göre kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Y4 ve Y6 grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında da TAMB sayısı *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayıları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

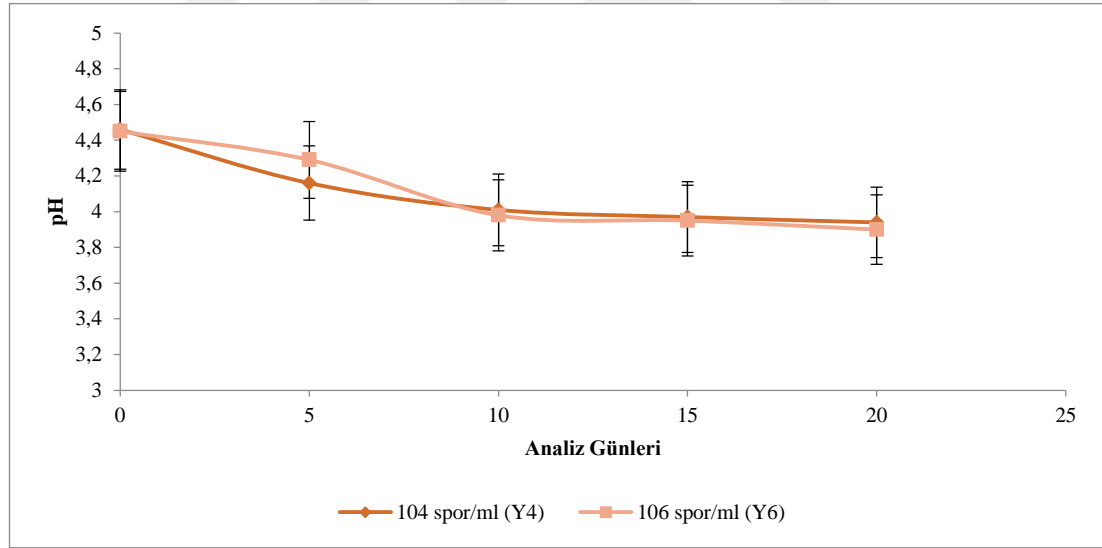
4.8.3. Yoğurtlarda pH ve Titrasyon Asitliği Değişimi

Yoğurdun depolanması süresince pH ve asitlik değişimi Tablo 15 ile Şekil 26 ve 27’de verilmiştir.

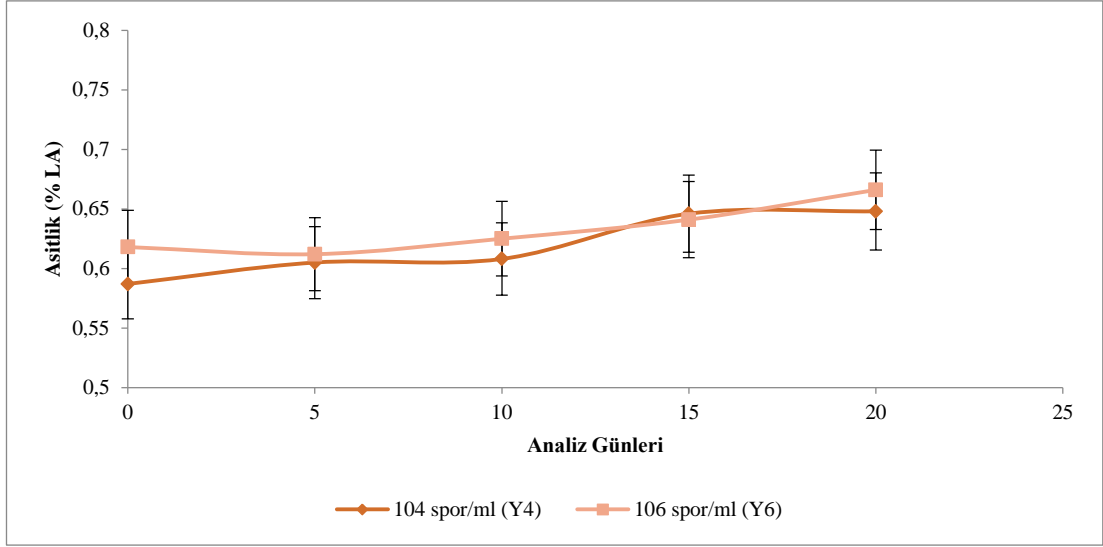
Tablo 15. Depolanma süresince yoğurtlarda pH ve asitlik (% LA) değişimi

Zaman (gün)	<i>C. difficile</i> spor inokülasyonu			
	10 ⁴ spor/ml (Y4)		10 ⁶ spor/ml (Y6)	
	pH	Asitlik (% LA)	pH	Asitlik (% LA)
0 ^x	4,46±0,309	0,587±0,00318	4,45±0,310	0,618±0,0334
5	4,16±0,0351	0,605±0,00318	4,29±0,289	0,621±0,0127
10	4,01±0,0493	0,608±0,0127	3,98±0,0351	0,625±0,0127
15	3,97±0,0404	0,646±0,0414	3,95±0,00	0,641±0,0350
20	3,94±0,0231	0,648±0,0191	3,90±0,0351	0,666±0,0509

^x: fermantasyon sonrası ölçüm



Şekil 26. Depolanma süresince yoğurtlarda pH değişimi



Şekil 27. Depolanma süresince yoğurtlarda asitlik (% LA) değişimi

Her iki grupta da kendi içinde değerlendirildiğinde günler arasında pH bakımında anlamlı fark olduğu ($p=0,022$) ancak titrasyon asitliği bakımından anlamlı değişim bulunmadığı saptanmıştır. Y4 ve Y6 gruplarının karşılaştırılmasında titrasyon asitliği ve pH bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmamızda insanlarda ortaya çıkan antibiyotik kullanımına bağlı şekillenen ishaller ile pseudomembranöz kolitlerde önemli bir yere sahip olan ve oransal olarak değerlendirildiğinde de söz konusu bozuklukların neredeyse % 30'undan sorumlu tutulan, spor oluşturma özelliğine sahip *C. difficile* bakterisinin seçilen süt ürünlerinde davranışının izlenmesi amaçlanmıştır. Ülkesel bazda yeterli ve kapsamlı veri bulunmasa da, verilerin nispeten daha düzenli tutulduğu Amerika Birleşik Devletlerinde, etkenin hastane kaynaklı ishallerde özellikle de klindamisin ve linkomisin kullanımına bağlı olarak şekillenen bağırsak sistemi bozukluklarında, *C. difficile* en önemli mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (Akkaya, & Hampikyan, 2019; Rodriguez-Palacios, Borgmann, Kline, & LeJeune, 2013). 2000'li yıllardan sonra ortaya çıkan hastalanma ve ölümlerle önemini daha da arttıran etkene bağlı olarak 2011 yılında ABD'de 453 000 adet hastalanma ve 29 000 ölüm rapor edilmiştir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2013).

Uzun süre antibiyotik kullanımına bağlı olarak bağırsak florasında baskın hale gelen mikroorganizma ishallerin yanı sıra kolitlere, megakolon olarak adlandırılan nispeten büyümüş kolon bozukluklarına, karaciğer ve dalakta apse odaklarının oluşmasına ve peritonitlere yol açmaktadır. Hastalanma ve ölüm oranı açısından bu denli önem arz eden mikroorganizmanın insanlara bulaşmasında gıdaların etkisi ve rolü birincil derecede olmasa da önemli bir yere sahiptir, çünkü yapılan değişik çalışmalarda etkenin insanlar gibi çiftlik hayvanlarının florasında da bulunabildiği ve dolayısıyla hayvansal gıdaların elde edilmesi ve işlenmesiyle gıdalara bulaşabilmekte ve gıda matriksinde uzun süre canlı kalabilmektedir (de Boer, Zwartkruis-Nahuis, Heuvelink, Harmanus, & Kuijper, 2011). Etkenin spor formu, çevresel koşullara oldukça direnç göstermekle birlikte pastörizasyon ve daha yüksek sıcaklıklardaki ısı işlem uygulamalarına, soğutma, asidifikasyon, düşük su aktivitesi gibi gıdalarda uygulanan engelleyici koşullara da oldukça dayanıklıdır. Sporlu yapının et ürünlerinde ısıya dayanımının test edildiği bir çalışmada etkenin pastörizasyon sıcaklıklarında inaktive edilemediği, total inaktivasyonun sağlanabilmesi için en azından 95° C'de 15 dakika boyunca sporların yüksek ısıya maruz bırakılması gerektiği belirlenmiştir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2010).

Bitkilerde verimi arttırmak için kullanılan kompostlar ile hayvansal gübrelerin sporlar için rezervuar görevi yapabileceği de yapılan çalışmalar ile raporlanmıştır. Dharmasena, & Jiang, (2018b) tarafından toksijenik *C. difficile* 'nin varlığının hem hayvan gübresi hem kompostlarda % 36 seviyelerinde bulunabileceği bildirilmiştir. Bu veriler etkenin bulaşmasında hayvansal gıdalar ile birlikte gübre veya kompostlarla temas etmiş olan bitkisel ürünlerin de risk oluşturabileceğini göstermektedir. Toksik özelliklere sahip *C. difficile* ile *C. perfringens*'in doğada bulunma sıklığı kıyaslandığında iki mikroorganizmanın birbirine benzer özellikler gösterdikleri belirlenmiştir (Lund, & Peck, 2015). Bu açıdan *C. difficile*'nin de ne kadar yaygın olabileceği hakkında fikir beyan edebiliriz.

Sporlar çiğ et başta olmak üzere farklı hayvansal gıdalardan, su ürünlerinden ve çiğ sebzelerden izole edilmiştir. Süt ineklerinin dışkılarında etkenin endosporlarının izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Dharmasena, Wei, Bridges, & Jiang, 2019). Bununla birlikte süt ve süt ürünlerine ilişkin bugüne kadar yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Et ve pastörize sütte *C. difficile* toksin genlerinin multipleks real-time PCR yöntemi ile araştırıldığı bir başka çalışmada *C. difficile* tespit edilemediği bildirilmiştir (Houser, Hattel, & Jayarao, 2010). Bir başka çalışmada baktöfugasyon uygulanan çiğ sütlerden kültür yöntemiyle *C. difficile* izole edilemediği ancak baktöfugatın yaklaşık 200 spor/mL içerdiği bildirilmiştir (Jöbstl ve ark., 2010). İran'da yapılan çalışmada ise inek sütünde *C. difficile* prevalansının % 1.43 (2/135) olduğu ve izolatlardan birinin 078 ribotip olduğu bildirilmiştir (Rahimi, Momtaz, & Hemmati, 2014b). Ülkemizde sütte *C. difficile*'ye ait toksin A ve B'nin Enzim İmmun Assay (EIA) yöntemi ile teşhisine yönelik bir çalışmada 165 süt örneğinin hiçbirinde bu toksinlere rastlanmamıştır (Liman, & Göğüsten, 2000). Peynirlerde PCR yöntemi (tespit limiti, 100 CFU/g) ile *C. difficile*'nin araştırıldığı bir çalışmada etken tespit edilememiştir (Le Bourhis ve ark., 2005). Kanada'da kültür yöntemiyle yapılan çalışmada, önceki çalışmalardan farklı olarak pastörize sütte ve peynirde *C. difficile* prevalansı sırasıyla % 2,0 ve % 9,6 olarak bulunmuş, peynirde bulunan yaygınlığın kıymada bulunan % 12,8 oranıyla yakın olmasına dikkat çekilmiştir. Ayrıca çalışmanın tespit limiti 10 spor/25 gram peynir veya süt olarak bildirilmiştir (Sugeng, 2012).

Etkene ilişkin temel bulaşma mekanizması fekal-oral yol olarak kabul edilmektedir. Oral olarak vücuda alınan mikroorganizmaların maruz kaldıkları en önemli bariyer mide asiditesidir. Yüksek asitlik mikroorganizmaların çok önemli bir kısmı için ölümcül etki göstermektedir. *C. difficile*'nin vejetatif formunun da diğer birçok mikroorganizma gibi mide asiditesine dayanım gösteremediği, ancak sporlu yapıların mide bariyerini aşarak bağırsaklara ulaştığı ve toksin oluşturabildiği raporlanmıştır (Peláez ve ark., 2013).

İçme sütü pastörize ya da UHT olarak adlandırılan yüksek ısı işleme maruz bırakılarak üretilmektedir. Pastörizasyon işlemi günümüzde teknolojik olarak plakalı ısıtıcılarda sütün 72 °C'de minimum 15 saniye boyunca tutulmasıyla gerçekleştirilmektedir. Daha uzun süreli olarak uygulanan ve geleneksel teknik olarak nitelendirilebilecek yöntemde ise süt çift cidarlı kazanlarda 63 °C'de 30 dakika boyunca ısı işleme maruz bırakılmaktadır. UHT işlemi 135 °C'de 1-4 saniye süren bir işlemdir. UHT işlemi ile sütün içinde bulunan tüm mikroorganizmaların hem vejetatif hem de sporlu yapıları yok edilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde UHT sütler hususunda başka kontaminasyon şekillenmediyse mikrobiyal risk söz konusu değildir.

Pastörizasyon işleminde ise sterilizasyon uygulanmamakta, patojen mikroorganizmaların vejetatif formlarının tümü yok edilebilmekle birlikte ısıya dirençli bazı mikroorganizmalar ile sporlu formlar yıkımlanamamaktadır. Bu durum sporlu yapılar hususunda daha hijyenik ve güvenilir tekniklerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu şekilde üretilen ürünlere ilişkin nispeten daha kısa tutulan raf ömrü ve tüketime kadar sürekli olarak buzdolabı sıcaklığında tutulma zorunluluğu bulunsa da bu koşullar mevcut spor varlığına etki etmemektedir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada pastörize sütte sporlu formların özellikle spor oluşturan basillusların uygulanan ısı işleme dayanım gösterdiği; pastörizasyon sonrası ürünlerdeki sporluların sayısal artışında uygulanan pastörizasyon ısısından (75, 80 ve 90 °C'de 20 s) ziyade ürünün raf ömrü boyunca tutulduğu sıcaklık derecesinin rol oynadığı belirtilmiştir. 14 günlük raf ömrü sonunda 3; 6,5 ve 10 °C'de tutulan örneklerde bakteri sayısı karşılıklı olarak 1,82; 3,55 ve 6,86 log kob/mL olarak belirlenmiş ve bunların arasında spor oluşturanların önemli yer tuttuğu belirtilmiştir (Lott, Wiedmann, & Martin, 2023).

Yapılan bu çalışmada temel amacımız deneysel olarak sporların pastörizasyon ısısında ve 20 güne kadar uzatılan raf ömrü süresince sütte davranışını gözlemlemektir. Literatürde basillus sporlarının pastörize sütlerde ve bunlardan üretilen süt ürünlerinde dayanımı ve davranışına ilişkin yapılmış olan birçok çalışma bulunmasına rağmen klostridiumlar hakkında çalışmalar sınırlıdır, özellikle de *C. difficile* hakkında yeterli veriye rastlanmamıştır. Sporlu yapıların pastörizasyona dayanım göstermesi dolayısıyla canlı kalan sporların ürünün raf ömrü esnasında nasıl davranış göstereceği merak konusudur. Bu soruya ışık tutmaya yönelik planladığımız çalışmanın yürütülmesinde mikroorganizmanın özellikle spor formunun uygun ve yeterli şekilde izolasyonu karşımıza farklı zorluklar çıkarmıştır. Spor saflaştırması ve sayımı aşamasında kullandığımız yöntemin kümelenme eğilimini artırması sebebiyle ATCC 9689 suşu için yeterli etkinlikte olmadığını belirledik. Benzer durum *C. difficile* ribotip 012 suşu üzerinde çalışan Lawley ve ark., (2009) tarafından da rapor edilmiştir. Test ettiğimiz bir diğer teknik olan gradiyent sükröz içeren Sorg yöntemi de benzer sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, literatürde sonikasyon adımı içeren ve daha başarılı olarak nitelendirilen saflaştırma yönteminin (Lawley Metodu) spor yapısını ve görünümünü etkilediği rapor edilmiştir (Malyshev, & Baillie, 2020). Spor yapısında şekillenen değişikliklerin sporun çevreye yapışma, adaptasyon yeteneği üzerinde etkili olabileceği bilinmektedir (Malyshev, & Baillie, 2020).

Çalışmamızda SEM ile görüntüleme yapılamadığı için sporların dış görünümü (düz, torba, ananas) hakkında detaylı veri edinilemedi ancak normal mikroskopik incelemelerde izlenen yapının literatür ile uyumlu morfolojik özelliklere sahip olduğu görüldü. Mikroorganizmanın kullanılan malzemelere (pipet, tüpler, cam ve plastik deney tüpleri, cam kavanozlar) tutunması ve yapışmasına ilişkin bir incelemenin yapılmamış olması çalışmamız açısından bir eksiklik olarak görülebilir.

Faz kontrast mikroskop ile yapılan sayımlarda parlak sporlar ile vejetatif hücreler birbirinden ayrıştırılabilir, bununla birlikte süreci kolaylaştırmak için hemasitometre ve özel boyamalar kullanılması tavsiye edilmektedir (Burns, & Minton, 2011). *C. difficile* spor sayımı için en çok kullanılan yöntemlerden bir diğeri de ısı aktivasyonu veya alkol şoku gibi bir stres işleminden sonra agar plaklarda koloni oluşturan birimlerin sayılmasıdır (Burns, & Minton, 2011). Çalışmamızda mikroskopik sayım ve kültür yöntemi ile yapılan spor sayım sonuçları arasında 1

log'dan daha az bir fark gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç ile Lawley ve ark., (2009)'nin *C. difficile* ribotip 012 suşuna uyguladıkları sonikasyon içeren yöntem etkinlik açısından benzerlik göstermektedir.

Sporlu formların çimlenme etkinliğinin belirlenmesine yönelik yaptığımız çalışmada, stok solüsyonu ile yapılan denemeler için çimlenme etkinliğinin % 99 seviyesi ile oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Bu oran uyguladığımız tekniğin başarılı olduğunu ifade etmektedir. Ancak 6 log spor/mL başlangıç inokülasyon seviyesi ile pastörize süt, kefir ve yoğurta yapılan spor ilavelerinde çimlenme etkinliği sırasıyla % 5,60; % 1,01 ve % 3,21 olarak hesaplanmıştır. İnokülasyon oranı 4 log spor/mL olarak uygulandığında da çimlenme etkinliğinin kefirde % 3,21, yoğurta % 5,15 hesaplanmıştır. Bu sonuçlar pastörize süt ve ürünlerde çimlenme etkinliğinin oldukça düşük kaldığını göstermektedir. Etkenin süt ve ürünlerdeki prevalans çalışmalarında neden düşük seviyelerde kaldığının sebeplerinden biri bu olabilir. Bir diğer sebepte süt veya ürünlerdeki matriks ortamında bulunan farklı komponentlere tutunma/bağlanma olabilir. Özellikle kefirdeki en düşük çimlenme/geri kazanım oranı ürünün granüler ve kompleks yapıya sahip olması ile izah edilebilir. Sütün kalsiyum yönünden zengin bir besin maddesi olması da geri kazanımdaki düşük seviyede rol alabilir. Kogermanin olarak görev yapan eksojen Ca^{+2} safra tuzlarıyla birlikte bir yandan çimlenmeyi tetiklerken, spor çekirdeğinden salınan endojen kalsiyum ise amino asit kogermaninlerinin indükleyici etkisiyle çimlenme sürecinin devamını ve tamamlanmasını sağlar (Lawler ve ark., 2020). Bu durumda sütte bulunan kalsiyum iyonlarının sporlarla etkileşime girerek çimlenme sürecini başlatması fakat ortam koşullarının çimlenmenin devamı için uygun olmaması sonucunda sporların tam anlamıyla çimlenememesi, sürecin sporların ölümüne yol açan bir istikamete yönlendirebilir. Bununla birlikte, klasik manada spor rehidrasyonu ve Ca^{2+} -DPA salınımının neden olduğu optik yoğunluktaki değişiklik olarak tanımlanan çimlenme işlemi şimdiye kadar kapsamlı ve bağımsız bir olgu olarak incelenmemiştir (Sorg, & Sonenshein, 2008).

Çimlenme yeteneğinin suşa bağlı olarak değişkenlik gösteren bir özellik olduğu bilinmektedir. Deng ve ark., (2015) tamponlanmış fosfat kullanarak yaptıkları çalışmada R20291 ve M120 suşlarının çimlenme etkinliğini sırayla % 0.03 ve % 35 olarak bildirmiştir. Araştırmacıların daha sonraki çalışmalarında ise bu oran BHIS-

ST agarda, R20291, M120 ve DK1 suşları için sırayla % 0.06, % 21 ve % 26 olarak bildirilmiştir (Deng ve ark., 2017). Suşlar arasındaki çimlenme etkinliğinin farkını açıklayan mekanizmalar henüz açıklanabilmiş değil ancak bu durumun sporlarının süper uyku durumunda olmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Deng ve ark., 2017).

Sütün pastörizasyonu gibi stres oluşturan işlemler bakterilerin canlı ama sayılamayan (VBNC) forma geçmesine neden olabilmektedir (Gunasekera, Sørensen, Attfield, Sørensen, & Veal, 2002). *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* gibi sporlu bakterilerin çeşitli stres koşullarında VBNC özelliği olduğu bildirilmiştir (Morawska, & Kuipers, 2022a, 2022b). Ancak literatürde *C. difficile*'nin VBNC formu varlığı bildirilmemiştir fakat tekrarlayan ısıtma işlemi karşı farklı bir hayatta kalma stratejisi olarak *C. difficile*, VBNC özelliğine sahip olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda, üretilen süt ürünlerinin prosesleri gereğince süte farklı sıcaklıklarda ısıtma işlemi uygulanmaktadır ve üretilen süt ürünlerinden alınan numuneler ekim işleminden önce tekrar 65 °C'de 30 dakika ısıtma işlemine maruz bırakılmıştır. Ekim prosedürümüzü oluştururken seçtiğimiz ısıtma işlemi ile ürünlerdeki refakatçi florayı ortadan kaldırmayı ve çimlenmeyi uyarılmayı hedeflemiştik (Edwards, & McBride, 2016; Weldy, Evert, Dosa, Khoruts, & Sadowsky, 2020). Çünkü spor çimlenme çalışmaları ısı ile aktive edilmiş sporların çimlenme etkinliklerinin daha yüksek olduğunu bildirmektedir (Edwards, & McBride, 2016; Paredes-Sabja ve ark., 2008). Yaptığımız ön denemelerde besiyerine kattığımız antibiyotik katkısının refakatçi floranın üremesine (özellikle kefirde) tam anlamıyla mani olamadığı gözlemlenmiştir. Her ne kadar, daha önceden yapılan çalışmada denenen 20 suşa 71°C'de pişirme sonrasında uygulanan 85 °C'de yeniden ısıtmanın bu suşların % 90'ının 10 dakika içinde öldüğü gözlemlenmiştir (Rodriguez-Palacios ve ark., 2010); uyguladığımız ekim öncesi ısıtma işleminin benzer etkiyi gösterip göstermeyeceğini bilmiyorduk. Dahası sporlar üzerindeki bu termal inhibitör etkiden kaçınmak için spor süspansiyonu hazırlanırken ısıtma işlemi içeren yöntemler kullanılmamıştır. Oysa spor stok süspansiyonu hazırlanmasında, spor çimlenmesini artırdığı için, ısı aktivasyonu önerilen bir uygulamadır (Edwards, & McBride, 2016; Paredes-Sabja ve ark., 2008).

Çalışmamızda düşük konstrasyonda (4 log) spor inokulasyonu yapılan gruplarda numunenin 1:10 sulandırma ile sayımının sağlıklı yapılamadığı da

gözlenmiştir. Bu gruplarda sulandırmanın 1:2 oranında yapılması halinde spor sayımı yapılabildiği gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak, gelecekte *C. difficile*'nin gıdalarda kalitatif ve kantitatif tespitine yönelik yapılacak çalışmalarda bu hususun göz önünde bulundurulması, analiz edilecek numune miktarının en az 25 mL veya gram olması, ayrıca dilüsyon oranının 1:1 veya 1:5 gibi seçilmesi analizlerin hassasiyeti ve sonuçların güvenilirliği açısından salık verilmektedir.

Amerika Birleşik Devletlerinde Gıda ve İlaç Ajansı (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) *L. lactis* bakterisi tarafından üretilen ve klostridiumlar dahil birçok gram (+) bakteri üzerine etkili olan nisin gıdalarda kullanımına izin vermiştir. Ayrıca nisin bazı diğer bileşenlerle kombine kullanımı neticesinde gram (-) mikroorganizmalar üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Sinamaldehit ve EDTA ile birlikte kullanıldığında Entero hemorajik *E. coli* (EHEC) üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir (Field ve ark., 2017). Oldukça küçük moleküler ağırlığa sahip olan nisin mikroorganizmalar üzerine olan etkisi hedef hücrenin sitoplazmik membranına saplanarak por oluşturması, ardından hücre içi elektrolit dengesinin bozulmasıdır. Hücre içinde bulunan monovalent katyonlar, ATP, amino asitler gibi komponentler açılan porlar neticesinde hücre dışına çıkmasına bağlı olarak hücre ölümü şekillenmektedir (Ruhr, & Sahl, 1985).

Nisin sporlu formlar üzerine özellikle klostridium ve basillus sporları üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Sporlar üzerine olan etkinin nisin yapısında bulunan didehidro amino asitler ile hedef hücrenin sitoplazmik membranındaki sülfidril grupların reaksiyona girmesinde şekillendiği fikri ön plana çıkmaktadır (Buchman, Banerjee, & Hansen, 1988; Morris, Walsh, & Hansen, 1984). Nisin vejetatif *C. difficile* hücreleri için güçlü aktiviteye sahiptir ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC₉₀) 0.256 mg/L'dir. Bu değer vankomisin ve metronidazole göre 8 kat daha fazladır (Bartoloni ve ark., 2004). İnsan kolon modelinde nisin tek doz olarak, 76 µmol/L (MIC değerinin 20 katı) kullanıldığında patojen ölmesinde etkili olduğu bulunmuştur (Le Lay, Fernandez, Hammami, Ouellette, & Fliss, 2015). Fakat bu dozun mikrobiyotada geçici değişikliklere neden olduğu, en çok gram-pozitif bakterilerin etkilendiği bildirilmiştir (Le Lay ve ark., 2015). Yine insan kolon modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, canlılık endikatörü olarak 16S rRNA test edilerek *C. difficile*'nin 50-500 µM konsantrasyonundaki nisin varlığında tamamen yok

edildiği gösterilmiştir (O'Reilly ve ark., 2023). Fermente et ürünlerinde nisin kullanarak *C. botulinum* ve klostridiumların inhibisyonuna yönelik yapılan bir çalışmada kayda değer sonuçlar elde edildiği ve nisin kullanımıyla nitrit kullanımının yarı yarıya azaltılabileceği rapor edilmiştir (Gill, & Holley, 2003).

Çalışmamızda süte 6 log spor/mL olarak inoküle edilen *C. difficile* sporlarının pastörizasyon sonrasında farklı dozlarda nisin ile yapılan muamelesinde çimlenme etkinliği 7,5-12,5-25 ve 50 ppm için sırasıyla % 3,89; % 4,41; % 3,81 ve % 0,98 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin hiç biri nisin katılmadan üretilen pastörize süt grubunun çimlenme yüzdesinden (% 5,67) büyük değildir ve 50 ppm nisin uygulanan grupta çimlenme yüzdesi en düşüktür. Ancak kullanılan dozlardaki nisin ilavesinin, *C. difficile* sporlarını tamamen inhibe etmeye yetmediği gösterilmiştir.

Nisinin aktivitesinin düşük kalması değişik nedenleri olabilir. Nisinin ortamdaki çözünürlüğü ortamın pH'sına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada nisin A'nın pH 2 seviyesindeki çözünürlüğü 57 mg/mL, pH 6'da ise 1,5 mg/mL seviyesine düştüğü rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan sütün pH'sının 6,5 seviyelerinde olduğu düşünülürse düşük aktivitenin çözünürlüğe bağlı olarak düşük kaldığı ifade edilebilir. Nisinin asidik koşullarda aktivitesinin artmasından dolayı nisin ile birlikte organik asitlerin birlikte kullanımı avantaj arz etmektedir. *Listeria monocytogenes*'in nisin ve laktik asit varlığında yıkımlanma oranının 6,7 log seviyelerine çıktığı rapor edilmiştir (Buncic, Fitzgerald, Bell, & Hudson, 1995). Benzer şekilde Ricotta peynirinde de nisinin asetik asitle birlikte kullanımının *L. monocytogenes* üzerine oldukça kuvvetli etki gösterdiği rapor edilmiştir (Bari ve ark., 2005). Çalışmamızda içme sütünde nisin ile birlikte başka bir katkının kullanılması yasal yönden uygun olmayacaktı ancak içme sütü yerine daha yüksek asitlik değerine sahip olan ayrıca çalışmamızda da denemelerini yaptığımız yoğurt ve kefirde nisinin aktivitesinin denememesi bir eksikliktir. Bundan sonraki çalışmalarda bu eksikliğin giderilmesi amacıyla süt ürünlerinde *C. difficile*'ye karşı nisin ve diğer inhibe edici uygun komponentlerin birlikte kullanılması ilginç sonuçlar verebilir.

Clostridioides difficile sporlarına karşı nisin ve lizozimin kombine olarak denendiği bir çalışmada sinerjik etkinin ayrı ayrı kullanımdan çok daha etkili sonuç verdiği belirtilmiştir (Chai, Lee, Imm, Kim, & Oh, 2017). Bunun da ötesinde, ısı

işleme nisinin birlikte kullanımının *C. sporogenes* sporlarına yalnız başlarına kullanıldığından daha etkili olduğu (Ros-Chumillas, Esteban, Huertas, & Palop, 2015), organik asit, nisin ve ısıl işlem uygulamasının ise oldukça yüksek inhibisyon sağladığı rapor edilmiştir (Naim ve ark., 2008). Benzer şekilde ısıl işlem ve nisin kullanımı *B. cereus* sporlarına karşı etkin olduğu çimlenmeyi ve sporülasyonu engellediği bildirilmiştir (Faille, Membre, Kubaczka, & Gavini, 2002). Gıda muhafazasında son yıllarda üzerinde durulan tekniklerden olan yüksek basınç uygulamasının nisin ve pediosin ile birlikte denediği bir çalışmada klostridium sporlarının etkin bir şekilde yıkımlandığı gözlenmiştir (Kalchayanand, Dunne, Sikes, & Ray, 2004).

Nisinin hidrofobik yapıda bir molekül olması da aktivitenin yağ oranı yüksek olan süt ve süt ürünlerindeki etkinliğinin düşük kalmasının bir nedeni olabilir. Yağ içeriği yüksek olan gıdalarda nisin bu yapısı dolayısıyla ürünün yağ fazında tutulması antimikrobiyal etkisini zayıflatabilir. Böyle gıdalarda daha yüksek konsantrasyonlarda nisin kullanılması tavsiye edilmiştir (Gill, & Holley, 2003).

Çalışmamızda etkenin hem pastörize süt, hem yoğurt hem de kefir örneklerinde 20 günlük depolama süresi boyunca sporların varlığını koruduğu, hatta 1 log/kob seviyesinde azalma için bile bu sürenin yeterli olmadığı saptanmıştır. *C. difficile* sporlarının ve vejetatif formlarının hayatta kalma becerileri üzerine yapılan çalışmalar uygun olmayan koşullarda bile *C. difficile*'nin uzun süre hayatta kalabildiğini göstermiştir. Süt ve ürünlerinde ürünlerinde olmasa da *C. difficile* sığırdışkısında ve toprakta 1 yıl boyunca canlı olarak kalabilir (Dharmasena ve ark., 2021). Flock, Yin, Chen, Pellissery, & Venkitanarayanan (2022) yaklaşık 5 log kob/g *C. difficile* ile kontamine ettikleri fermente domuz sosislerinde 4 °C'de 90. güne kadar uzayan depolama sonunda spor canlılığında sadece marjinal bir azalma olduğunu bildirilmiştir. McSharry ve ark. (2021) ise yaklaşık 3 log kob/ml spor içeren inokulumla kontamine ettikleri et numunelerinde etkenin aerobik, anaerobik ve ticari vakum paketlerde hayatta kalmasının 2 °C ve 20 °C'de incelemiş ve 2 °C'de tutulan etlerde 32 günlük depolamada istikrarlı bir azalış görüldüğünü; 20 °C'de tutulanlarda ise 8. günde 5 log kob/gr seviyelerine kadar artış gözlemlendiğini bildirmiştir. Doğal olarak dayanıklı olan spor formları test ettiğimiz ürünlerin hiçbirinde buzdolabı ısısında çimlenme niteliği gösteremez ancak canlılığını da

korur. Bu durum diğerk sporlu klostridiumlarda olduğu gibi *C. difficile* içinde halk sağlığı açısından sorun oluşturmaktadır. Çünkü vucuda alınan sporlar bağırsaklarda vejetatif forma dđnüşup sağlığı tehdit eder konuma geçebilirler. Yoğurt bakterilerinin in vivo yedirme deneyi ile *C. difficile* üzerine etkilerini test etmeye yđnelik hamsterler ile yapılan bir çalışmada yoğurt bakterilerine ilişkin herhangi olumlu bir etki ortaya konulamamıştır (Kotz ve ark., 1992). Buna karşılık, yakın tarihli bir n çalışmada araştırmacılar yanık merkezindeki antibiyotik alan hastalarda kefir alımının *C. difficile* üzerine olan sonuçlarının mit verici olduğunu ve konu hakkında kapsamlı çalışmaların sürdürülmekte olduğunu rapor etmişlerdir (Lillie, Nordlund, Stewart, & Gause, 2022). Özellikle kefirdeki farklı mikrobiyal popülasyonların klostridiumlar üzerine etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Tez alışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; hayvanların ve insanların florasında bulunan ve halk sağlığı açısından önemli bir mikroorganizma olan *C. difficile*'nin sporlarının pastörize süt, yoğurt ve kefir gibi ürünlere uygulanan ısıl işlemlere dayanıklı olduğunu, etkenin bulaşmasında gıdaların etkin rol oynayabileceğini, nisinin özellikle pastörize sütte tek başına kullanımının kısıtlı etki gösterse de etkeni tamamen inhibe edemeyeceğini ve ürünlerin raf ömrü süresince zarar görmeden canlılığını koruyabileceğini göstermiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde özellikle son yıllarda giderek daha fazla önem kazanan *C. difficile*'ye karşı kapsamlı çalışmaların yapılması bir gereklilik olarak grlmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abay, S., Ahmed, E. F., Aydin, F., Karakaya, E., & Müştak, H. K. (2022). Presence of *Clostridioides difficile* in cattle feces, carcasses, and slaughterhouses: Molecular characterization and antibacterial susceptibility of the recovered isolates. *Anaerobe*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102575>
- Akkaya, E., & Hampikyan, H. (2019). *Clostridioides (Clostridium) difficile* and its Presence in Food. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(4), 175–185. <https://doi.org/10.5222/tmcd.2019.175>
- Ali, A. H., Hale, T. W., Khasawneh, F. A., Urban, R. S., Werner, H. V., & Smalligan, R. D. (2013). NISIN and *clostridium difficile*: A potentially effective treatment for an increasingly problematic disease. *American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 625. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.474>
- Atasoy, F., & Gücükoğlu, A. (2017). Detection of *Clostridium difficile* and toxin genes in samples of modified atmosphere packaged (MAP) minced and cubed beef meat. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(Cdi), 165–170.
- Bari, M. L., Ukuku, D. O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1381–1387. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1381>
- Bartoloni, A., Mantella, A., Goldstein, B. P., Dei, R., Benedetti, M., Sbaragli, S., & Paradisi, F. (2004). In-Vitro Activity of Nisin Against Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Journal of Chemotherapy*, 16(2), 119–121. <https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.2.119>
- Bauer, M. P., & Kuijper, E. J. (2015). Potential Sources of *Clostridium difficile* in Human Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.010>
- Bingol, E. B., Hampikyan, H., Muratoglu, K., Akkaya, E., Cetin, O., & Colak, H. (2020). Characterisation and antibiotic susceptibility profile of *Clostridioides (Clostridium) difficile* isolated from chicken carcasses. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 64(3), 407–412. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0052>
- Bolla, P. A., Carasi, P., Bolla, M. de los A., De Antoni, G. L., & Serradell, M. de los A. (2013). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 21, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.010>
- Buchman, G. W., Banerjee, S., & Hansen, J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 263(31), 16260–16266. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37587-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37587-2)
- Buggy, B. P., Hawkins, C. C., & Fekety, R. (1985). Effect of adding sodium taurocholate to selective media on the recovery of *Clostridium difficile* from environmental surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(4), 636–637. <https://doi.org/10.1128/jcm.21.4.636-637.1985>
- Buncic, S., Fitzgerald, C. M., Bell, R. G., & Hudson, J. A. (1995). Individual and Combined Listericidal Effects of Sodium Lactate, Potassium Sorbate, Nisin and Curing Salts At Refrigeration Temperature. *Journal of Food Safety*, 15(3), 247–264. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1995.tb00137.x>

- Burns, D. A., & Minton, N. P. (2011). Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *Journal of Microbiological Methods*, 87, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.017>
- Cadnum, J. L., Hurless, K. N., Deshpande, A., Nerandzic, M. M., Kundrapu, S., & Donskey, C. J. (2014). Sensitive and selective culture medium for detection of environmental *Clostridium difficile* isolates without requirement for anaerobic culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00793-14>
- Candel-Pérez, C., Ros-Berrueto, G., & Martínez-Graciá, C. (2019). A review of Clostridioides [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain. *Food Microbiology*, 77(May 2018), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.012>
- Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Serradell, M. de los A. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize invitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, 18(1), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.002>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic resistance threats. İçinde *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- Chai, C., Lee, K.-S., Imm, G.-S., Kim, Y. S., & Oh, S.-W. (2017). Inactivation of *Clostridium difficile* spore outgrowth by synergistic effects of nisin and lysozyme. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(7), 638–643. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0550>
- Chai, C., Lee, K. S., & Oh, S. W. (2015). Synergistic inhibition of *Clostridium difficile* with nisin-lysozyme combination treatment. *Anaerobe*, 34, 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.003>
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). *Bacteriocins : safe , natural antimicrobials for food preservation*.
- Cox, M. E., McDonald, J. N., & St Onge, M. M. (2018). Sporulation Efficiency of *Clostridium difficile* in Four Pre-Reduced , Anaerobically-Sterilized Broth Formulations. Erişim adresi: <https://anaerobesystems.com/wp-content/uploads/2018/10/Sporulation-and-Germination-of-C-difficile-in-various-media.pdf>
- Curry, S. (2010). *Clostridium difficile*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.001>
- Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ (2017/20). (2017, 27 Nisan) *Resmi Gazete* (Sayı:30050) Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/04/20170427-2.htm>
- Da Costa, R. J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2019). Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>
- De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, A., Heuvelink, A. E., Harmanus, C., & Kuijper, E. J. (2011). Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The

- Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 561–564. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.007>
- Deng, K., Plaza-Garrido, A., Torres, J. A., & Paredes-Sabja, D. (2015). Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiology*, 46, 218–221. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.022>
- Deng, K., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Paredes-Sabja, D., & Torres, J. A. (2017). Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity. *Food Microbiology*, 65, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.013>
- Dharmasena, M. (2018a). Evaluation of Animal Manure-based Compost as an Environmental Source of *Clostridium difficile*. *ProQuest Dissertations and Theses*, 204. Erişim adresi: <https://proxying.lib.ncsu.edu/index.php/login?url=https://www.proquest.com/docview/2058073656?accountid=12725%0Ahttp://js8lb8ft5y.search.serialssolutions.com/directLink?&atitle=Evaluation+of+Animal+Manure-based+Compost+as+an+Environmental+Source+of+Clostr>
- Dharmasena, M., & Jiang, X. (2018b). Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from animal manure and composts being used as biological soil amendments. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.000738-18>
- Dharmasena, M., Wang, H., Wei, T., Bridges, W. C., & Jiang, X. (2021). Survival of *Clostridioides difficile* in finished dairy compost under controlled conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 996–1006. <https://doi.org/10.1111/jam.15001>
- Dharmasena, M., Wei, T., Bridges, W. C., & Jiang, X. (2019). Thermal resistance of *Clostridium difficile* endospores in dairy compost upon exposure to wet and dry heat treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 274–283. <https://doi.org/10.1111/jam.14295>
- Edwards, A. N., & McBride, S. M. (2016). Isolating and Purifying *Clostridium difficile* Spores. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1476, 117–128. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6361-4_9
- Ersöz, Ş. S., & Coşansu, S. (2014). *Clostridium difficile*: Özellikleri ve Gıdalarla İlişkisi *Clostridium difficile*: Its Properties and Relationship with Foods. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(3), 58–68.
- Ersöz, Ş. Ş., & Coşansu, S. (2018). Prevalence of *Clostridium difficile* Isolated from Beef and Chicken Meat Products in Turkey. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(4), 759–767. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e14>
- Faille, C., Membre, J.M., Kubaczka, M., Gavini, F., (2002). Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. *Journal of Food Protection* 65(12): 1930-1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1930>
- FAO. (2013). Nisin. *FAO JECFA Monographs 14*. Erişim adresi: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph14/additive-295-m14.pdf
- Field, D., Baghou, I., Rea, M. C., Gardiner, G. E., Paul Ross, R., & Hill, C. (2017). Nisin in combination with cinnamaldehyde and EDTA to control growth of *Escherichia coli* strains of swine origin. *Antibiotics*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040035>

- Flock, G., Chen, C., Yin, H., Fancher, S., Mooyottu, S., & Venkitanarayanan, K. (2015). Effect of chilling, freezing and cooking on survivability of clostridium difficile spores in ground beef. *Meat Science*, 112, 161. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.133>
- Flock G., Yin H.B., Chen C.H., Pellissery A.J., & Venkitanarayanan K. (2022) Survivability of Clostridioides difficile spores in fermented pork summer sausage during refrigerated storage. *Vet World*. Jan;15(1):162-167. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.162-167>
- Galdys, A. L., Curry, S. R., & Harrison, L. H. (2014). Asymptomatic {Clostridium} difficile colonization as a reservoir for {Clostridium} difficile infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(8), 967–980. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.920252>
- Garneau, J. R., Valiquette, L., & Fortier, L. C. (2014). Prevention of Clostridium difficile spore formation by sub-inhibitory concentrations of tigecycline and piperacillin/tazobactam. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-29>
- Gerding, D. N. (2009). Clostridium difficile 30 years on: what has, or has not, changed and why? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(SUPPL. 1), S2–S8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70008-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70008-1)
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). Clostridium difficile binary toxin CDT. *Gut Microbes*, 5(1), 15–27. <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>
- Ghoddusi, H. B., & Thomas, L. V. (2017). Microbiota of the Human Gut. İçinde *Probiotic Dairy Products* (ss. 1–15). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119214137.ch1>
- Gil, F., Lagos-Moraga, S., Calderón-Romero, P., Pizarro-Guajardo, M., & Paredes-Sabja, D. (2017). Updates on Clostridium difficile spore biology. *Anaerobe*, 45, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.018>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251–259. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00171-X)
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., ... Kuijper, E. J. (2008). Emergence of Clostridium difficile Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, 47(9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1086/592257>
- Gunasekera, T. S., Sørensen, A., Attfield, P. V., Sørensen, S. J., & Veal, D. A. (2002). Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1988–1993. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1988-1993.2002>
- Guran, H. S., & Ilhak, O. I. (2015). Clostridium difficile in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(4), 359–364. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0950-z>
- Hampikyan, H., Bingol, E. B., Muratoglu, K., Akkaya, E., Cetin, O., & Colak, H. (2018). The prevalence of Clostridium difficile in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. *Meat Science*, 139(January), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.020>

- Han, S. B., Chang, J., Shin, S. H., Park, K. G., Lee, G. D., Park, Y. G., & Park, Y. J. (2014). Performance of chromID *Clostridium difficile* agar compared with BBL *C. difficile* selective agar for detection of *C. difficile* in stool specimens. *Annals of Laboratory Medicine*, 34(5), 376–379. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.5.376>
- Hanchi, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J., ... Fliss, I. (2017). Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: Synergy with bacteriocins and antibiotics. *Future Microbiology*, 12(3), 205–212. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>
- Hofstetter, S., Gebhardt, D., Ho, L., Gänzle, M., & McMullen, L. M. (2013). Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. *Food Microbiology*, 34(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.001>
- Houser, B. A., Hattel, A. L., & Jayarao, B. M. (2010). Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of *Clostridium difficile* Toxin-Encoding Strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(6), 719–726. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0483>
- Hutton, M. L., Mackin, K. E., Chakravorty, A., & Lyras, D. (2014). Small animal models for the study of *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 352(2), 140–149. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12367>
- Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., Huhulescu, S., & Allerberger, F. (2009). *Clostridium difficile*: A new zoonotic agent? *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3–4), 91–95. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1127-x>
- Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Köfer, J., & Wagner, M. (2010). *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022>
- Kalchayanand, N., Dunne, C. P., Sikes, A., & Ray, B. (2004). Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.02.004>
- Keessen, E. C., van den Berkt, A. J., Haasjes, N. H., Hermanus, C., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. A. (2011). The relation between farm specific factors and prevalence of *Clostridium difficile* in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 154(1–2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.032>
- Kotz, C. M., Peterson, L. R., Moody, J. A., Savaiano, D. A. & Levitt M. D. (1992). Effect of yogurt on clindamycin-induced *Clostridium difficile* colitis in hamsters. *Digestive Diseases and Sciences*, Jan;37(1):129-32. doi: 10.1007/BF01308355.
- Kurt, Ş., & Zorba, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77–83. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/yyuvfd/issue/13745/166408>
- Larson, H. E., Price, A. B., & Borriello, S. P. (1980). Epidemiology of experimental enterococitis due to *Clostridium difficile*. *Journal of Infectious Diseases*, 142(3). <https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.408>

- Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P., & Borriello, S. P. (1978). Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, 1(8073), 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90912-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90912-1)
- Lawler, A. J., Lambert, P. A., & Worthington, T. (2020). A Revised Understanding of Clostridioides difficile Spore Germination. *Trends in Microbiology*, 28(9), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.004>
- Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., ... Dougan, G. (2009). Proteomic and genomic characterization of highly infectious Clostridium difficile 630 spores. *Journal of Bacteriology*, 191(17), 5377–5386. <https://doi.org/10.1128/JB.00597-09>
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., & Tholozan, J.-L. (2005). Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 29–38. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.29-38.2005>
- Le Lay, C., Dridi, L., Bergeron, M. G., Ouellette, M., & Fliss, I. (2016). Nisin is an effective inhibitor of Clostridium difficile vegetative cells and spore germination. *Journal of Medical Microbiology*, 65(2), 169–175. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000202>
- Le Lay, C., Fernandez, B., Hammami, R., Ouellette, M., & Fliss, I. (2015). On Lactococcus lactis UL719 competitiveness and nisin (Nisaplin®) capacity to inhibit Clostridium difficile in a model of human colon. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01020>
- Leffler, D. A., & Lamont, J. T. (2015). Clostridium difficile Infection. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1539–1548. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772>
- Lewis, M. J., & Deeth, H. C. (2014). Heat Treatment of Milk. İçinde A. Tamime (Ed.), *Milk Processing and Quality Management* (ss. 168–204). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444301649.ch7>
- Lillie, A., Nordlund, M., Stewart, B. T., & Gause, E. L. (2022). 717 Critically injured patients receiving kefir may have lower rates of Clostridium difficile. *Journal of Burn Care & Research*, 43(Supplement_1), S164–S164. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irac012.271>
- Lim, S. C., Foster, N. F., & Riley, T. V. (2016). Susceptibility of Clostridium difficile to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite. *Anaerobe*, 37, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.004>
- Liman, B. C., & Göğüsten, B. (2000). Sütlerde Stafilokokkal Enteroksin, Verotoksin 1-2 Ve Klostridium Diffisile Toksinlerinin EIA ile Araştırılması. Kayseri: TÜBİTAK VHAG-1534 No'lu Proje. Erişim adresi: <https://search.trdizin.gov.tr/tr/yayin/detay/605288/sutlerde-stafilokokkal-enterotoksin-verotoksin-1-2-ve-klostridium-diffisile-a-b-ttoksinlerinin-eia-ile-arastirilmesi>
- Lott, T. T., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2023). Shelf-life storage temperature

- has a considerably larger effect than high-temperature, short-time pasteurization temperature on the growth of spore-forming bacteria in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 3838–3855. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22832>
- Lund, B. M., & Peck, M. W. (2015). A Possible Route for Foodborne Transmission of *Clostridium difficile*? *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3), 177–182. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1842>
- Malyshev, D., & Baillie, L. (2020). Surface morphology differences in *Clostridium difficile* spores, based on different strains and methods of purification. *Anaerobe*, 61, 102078. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102078>
- Marsh, J. W. (2013). Counterpoint: Is *Clostridium difficile* a food-borne disease? *Anaerobe*, 21, 62–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.004>
- McSharry, S., Koolman, L., Whyte, P., & Bolton, D. (2021). An investigation of the survival and/or growth of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in beef stored under aerobic, anaerobic and commercial vacuum packaging conditions at 2 °C and 20 °C. *Food Control*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107475>
- Metcalf, D., Avery, B. P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., & Weese, J. S. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17(2), 85–86. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.02.008>
- Moore, P., Kyne, L., Martin, A., & Solomon, K. (2013). Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1405–1413. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056614-0>
- Morawska, L. P., & Kuipers, O. P. (2022a). Antibiotic tolerance in environmentally stressed *Bacillus subtilis*: physical barriers and induction of a viable but nonculturable state. *microLife*, 3(June), 1–18. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqac010>
- Morawska, L. P., & Kuipers, O. P. (2022b). Transcriptome analysis and prediction of the metabolic state of stress-induced viable but non-culturable *Bacillus subtilis* cells. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21102-w>
- Morris, S. L., Walsh, R. C., & Hansen, J. N. (1984). Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21), 13590–13594. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)90734-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)90734-9)
- Mousavi, A., Abhari, K., Ismail, E., Soares, M. B., Oliveira, R. B. A., Hosseini, H., ... Sant, A. S. (2020). Trends in Food Science & Technology Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 95(November 2019), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.022>
- Muratoğlu, K., Akkaya, E., Hampikyan, H., Bingol, E. B., Cetin, Ö., Colak, H. (2020). Detection, Characterization and Antibiotic Susceptibility of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Meat Products. *Food Science of Animal Resources*, 40(4), 578-587. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e34>
- Naim, F., Zareifard, M. R., Zhu, S., Huizing, R. H., Grabowski, S., & Marcotte, M. (2008). Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: From kinetics to process validation. *Food Microbiology*, 25(7), 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.005>

- Nerandzic, M. M., & Donskey, C. J. (2013). Activate to Eradicate: Inhibition of *Clostridium difficile* Spore Outgrowth by the Synergistic Effects of Osmotic Activation and Nisin. *PLoS ONE*, 8(1), e54740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054740>
- O'Reilly, C., Grimaud, G. M., Coakley, M., O'Connor, P. M., Mathur, H., Peterson, V. L., ... Ross, R. P. (2023). Modulation of the gut microbiome with nisin. *Scientific Reports*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34586-x>
- Özgen, E. K. (2018). *Genç Çiftlik Hayvanlarında İshal Vakalarından, Clostridium difficile'in izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi.*[Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://acikerisim.kku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12587/15843?locale-attribute=en>
- Özgen, E. K., & Yıldırım, M. (2018). Neonatal Dönem Buzağı İshallerinde *Clostridium difficile*. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 7(1), 33–41. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/bdhad/issue/38673/449410>
- Paredes-Sabja, D., Bond, C., Carman, R. J., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008). Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). *Microbiology*, 154(8), 2241–2250. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016592-0>
- Paredes-Sabja, D., Shen, A., & Sorg, J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, C. 22, ss. 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>
- Peláez, T., Alcalá, L., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., Marín, M., Martín-López, A., ... Bouza, E. (2013). Characterization of swine isolates of *clostridium difficile* in Spain: A potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe*, 22, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.009>
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. P. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin. A (tcdA) and toxin. B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1057–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x>
- Rahimi, E., Jalali, M., & Weese, J. S. (2014a). Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health*. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-119>
- Rahimi, E., Momtaz, H., & Hemmati, M. (2014b). Occurrence of *Clostridium difficile* in Raw Bovine, Ovine, Caprine, Camel and Buffalo Milk in Iran. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20(3), 371–374. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.10175>
- Rodriguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T. R., & LeJeune, J. T. (2013). *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Animal Health Research Reviews*, 14(1), 11–29. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000229>
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., & Weese, J. S. (2010). *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe*, 16(5), 540–542. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.05.004>
- Rodriguez, C., Avesani, V., Van Broeck, J., Taminiau, B., Delmée, M., & Daube, G.

- (2013). Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.017>
- Rodriguez, C., Van Broeck, J., Taminiâu, B., Delmée, M., & Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*, 97, 59–78. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.018>
- Ros-Chumillas, M., Esteban, M. D., Huertas, J. P., & Palop, A. (2015). Effect of nisin and thermal treatments on the heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores. *Journal of Food Protection*, 78(11), 2019–2023. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-083>
- Roux, H., Le Guern, R., Courcol, R. J., & Gaillot, O. (2014) Comparison of CHROMagar C. *difficile* and taurocholate-CCFA media for isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from stools. [Poster American Society for Microbiology 2014, Boston]
- Erişim adresi: https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/10/1405697639ASM_2053_Olivier_GAILLOT_1_.pdf
- Ruhr, E., & Sahl, H. G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(5), 841–845. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.5.841>
- Salman, E., Levent, B., & Karahan, Z. C. (2017). Toksin Pozitif *Clostridium difficile* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları ve Moleküler Karakterizasyonu: Türkiye’den Hipervirülan Suşların Varlığı ile İlişkili İlk Bildirim. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(3), 236–246. <https://doi.org/10.5578/mb.57467>
- Scholtzek, A. D., Heise, J., Witt, P., Hanuschik, A. M., & Maurischat, S. (2022). Contamination of home-grown and retail vegetables with *Clostridioides difficile*. *Anaerobe*, 74(November 2018), 102512. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102512>
- Schoster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P. D., Bello, F. D., & Guardabassi, L. (2013). In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*, 20, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.006>
- Sepulveda-Diaz, R. V. (2013). *Prevalence of Clostridium difficile in retail meats from Minnesota and comparison of growth and survival of human and animal isolates* (Publication No. 4449) [Master's Thesis, University Of Minnesota] Erişim adresi: <https://conservancy.umn.edu/handle/11299/160297>
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C., & Limbago, B. M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Public Health Resources*, 15(5), 819–821. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081071>
- Sorg, J. A., & Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2505–2512. <https://doi.org/10.1128/JB.01765-07>

- Sorg, J. A., & Sonenshein, A. L. (2010). Inhibiting the Initiation of *Clostridium difficile* Spore Germination using Analogs of Chenodeoxycholic Acid, a Bile Acid. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4983–4990. <https://doi.org/10.1128/JB.00610-10>
- Spinler, J. K., Brown, A., Ross, C. L., Boonma, P., Conner, M. E., & Savidge, T. C. (2016). Administration of probiotic kefir to mice with *Clostridium difficile* infection exacerbates disease. *Anaerobe*, 40(5), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.008>
- Srisuwan, S., Mackin, K. E., Hocking, D., Lyras, D., Bennett-Wood, V., Voravuthikunchai, S. P., & Robins-Browne, R. M. (2018). Antibacterial activity of rhodomyrone on *Clostridium difficile* vegetative cells and spores in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.014>
- Sugeng, C. K. (2012). *Determining the Growth Limiting Conditions and Prevalence of Clostridium difficile in Foods* [Master's Thesis, University of Ottawa]. <https://doi.org/10.20381/RUOR-5813> Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/10393/22889>
- Tamime. (2006). Probiotic Dairy Products. İçinde A. Tamime (Ed.), *Probiotic Dairy Products*. Oxford, UK: Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470995785>
- Tanaka, Y., Kimura, S., Ishii, Y., & Tateda, K. (2019). Equol inhibits growth and spore formation of *Clostridioides difficile*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 932–940. <https://doi.org/10.1111/jam.14353>
- Thanissery, R., Winston, J. A., & Theriot, C. M. (2017). Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. *Anaerobe*, 45, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.004>
- Tkalec, V., Janezic, S., Skok, B., Simoncic, T., Mesaric, S., Vrabec, T., & Rupnik, M. (2019). High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes compared to some other vegetables in Slovenia. *Food Microbiology*, 78, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.017>
- Trejo, F. M., Minnaard, J., Perez, P. F., & De Antoni, G. L. (2006). Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe*, 12(4), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.03.004>
- Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (2023, 23 Ekim) *Resmi Gazete* (Sayı: 32338 Mükerrer) Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2023/10/20231013M1-1.htm>
- Türk Standartları Enstitüsü. (1993). TS 10935 Yoğurt Yapım Kuralları. *Türk Standardı*. Erişim adresi: <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?053107106111065067115113049116090107100056052055108081090071086075069085047110067109075073081116103090081086073108065117084119099099043100086066081082088065081051087090098085113102048090055099>
- Türk Standartları Enstitüsü. (2021). TS 1330 Yoğurt. *Türk Standardı*. Erişim adresi: <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?08111805111510805110411911010405504710510212008811104311310407310204908909712111122051085066052>
- Türk Standartları Enstitüsü. (2022a). TS1018 İnek Sütü-Çiğ. *Türk Standardı*. Erişim

adresi:

<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073102053056105103114116119067119097>

- Türk Standartları Enstitüsü. (2022b). TS 1019:2022 Pastörize Süt. *Türk Standardı*. Erişim adresi: <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073089080102053075071079082086066051>
- Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Tamura, Y. (2017). Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, 43, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.004>
- Von Abercron, S. M. M., Karlsson, F., Wigh, G. T., Wierup, M., & Krovacek, K. (2009). Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1732–1734. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1732>
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S., & Weese, S. J. (2017). Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.13338>
- Wastra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (Second Edi). Taylor & Francis.
- Weese, J. S., Reid-Smith, R. J., Avery, B. P., & Rousseau, J. (2010). Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 362–365. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x>
- Weese, J. S., Staempfli, H. R., & Prescott, J. F. (2000). Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(4), 332–336. <https://doi.org/10.1177/104063870001200406>
- Weese, J. S., Rousseau, J., Deckert, A., Gow, S., & Reid-Smith, R. J. (2011). *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-41>
- Weldy, M., Evert, C., Dosa, P. I., Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2020). Convenient Protocol for Production and Purification of *Clostridioides difficile* Spores for Germination Studies. *STAR Protocols*, 1(2), 100071. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100071>
- Wheeldon, L. J., Worthington, T., Hilton, A. C., Elliott, T. S. J., & Lambert, P. A. (2008). Physical and chemical factors influencing the germination of *Clostridium difficile* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2223–2230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03965.x>
- Yang, H. T., Chen, J. W., Rathod, J., Jiang, Y. Z., Tsai, P. J., Hung, Y. P., ... Huang, I. H. (2018). Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02635>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
°SH	: Soxhlet Henkel Derecesi
µg	: Mikrogram
µg	: Mikrogram
A	: Nisin ilave edilmeyen kontrol pastörize süt grubu
B	: 7,5 ppm konsantrasyonunda nisin ilave edilen pastörize süt grubu
BHI	: Brain Heart Infusion Toksinotip III, restriksiyon endonükleaz analiz grup BI, North
BI/NAP1/027	: American pulsed-field gel elektroforezis tip NAP1 ve polimeraz zincir reaksiyon tip 27 olan <i>C. difficile</i> suşu
C	: 12,5 ppm konsantrasyonunda nisin ilave edilen pastörize süt grubu
<i>C. difficile</i>	: <i>Clostridioides difficile</i>
CCFA	: Cycloserine-sefoxitin Fruktose Agar
CDBB-TC	: Sikloserin-sefoksitin ve nötral kırmızı içeren brusella sıvı besiyeri
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CdeC	: Sistein-zengin proteini
CDI	: <i>C. difficile</i> infeksiyonları
CDMN	: Moksalaktam-norfloksasin ilave edilmiş Fastidious Anaerobe Agar <i>C. difficile</i> 'de spor çimlenmesinde, psödoproteaz olarak görev yapan enzim
Csp	: enzim
D	: 25 ppm konsantrasyonunda nisin ilave edilen pastörize süt grubu
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPA	: Dipikolinik asit
E	: 50 ppm konsantrasyonunda nisin ilave edilen pastörize süt grubu
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı
EHEC	: Enterohemorajik Escherichia coli
FBHIYST-NR	: Fruktoz Brain Heart Infusion, Maya Ekstraktı, Sodyum Taurokolat-Nötral Red
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	: Gram
g/ml	: Gram/mililitre
GRAS	: Generally Recognized As Safe
HCl	: Hidroklorik asit
HDCA	: Hiyodeoksikolat
Ig G	: İmmunglobulin G
K4	: Yaklaşık olarak 104 spor/ml dozunda <i>C. difficile</i> ilave edilen kefir grubu
K6	: Yaklaşık olarak 106 spor/ml dozunda <i>C. difficile</i> ilave edilen kefir grubu
Kob/g	: Koloni oluşturma birimi/gram
kob/ml	: Koloni oluşturma birimi/mililitre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LCA	: Lithokolat
M	: Molar
MRD	: Çoklu İlaç Direnci
NaOH	: Sodyum hidroksit
PaLoc	: patojenite lokusunda
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDA	: Patota Dextrose Agar

ppm	:	Milyon başına bir
PYG	:	Pepton Yeast Glucose
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R078	:	Toplum ilişkili infeksiyonlarından izole edile <i>C. difficile</i> suşu
Rho GTPaz	:	Tüm ökaryotlarda bulunan, hücre içi aktin dinamiğinin bir çok yönünü düzenleyen proteinler
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
SleC	:	<i>C. difficile</i> 'de spor çimlenmesinde, görev yapan litik enzim
ST	:	Sodyum Taurokolat
TAMB	:	Toplam Aerobik Mezofil Bakteri
TCA	:	Taurokolat
TcdA	:	Toksin A
TcdB	:	Toksin B
TS	:	Triptik Soy
TSE	:	Türk Standartları Enstitüsü
U	:	Ünite
UDCA	:	Ursodeoksikolat
UV	:	Ultraviöle
Y4	:	yaklaşık olarak 10 ⁴ spor/ml dozunda <i>C. difficile</i> ilave edilen yoğurt grubu
Y6	:	yaklaşık olarak 10 ⁶ spor/ml dozunda <i>C. difficile</i> ilave edilen yoğurt grubu
µg/ml	:	Mikrogram/mililitre
µl	:	Mililitre
ωMCA	:	ω-murikolat

8. TEŞEKKÜR

Yaklaşık bir asır önce keşfedilen ve 90'lı yıllarda hakkındaki önemli birçok bilginin bilindiğinden artık yaşamı tehdit eden bir patojen olmadığı kanaati getirilen ancak şu an hakkında az şey bildiğimizi kabul etmemiz gereken, ciddi bir antibiyotik direnci tehditi olan *Clostridioides difficile*, nam-ı diğer zor bakteri üzerinde çalışmak, benim için tarif edilemez bir deneyimdi. Bana bu fırsatı sunan, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, değerli katkılarını esirgemeyen, gerek Lisans gerek Doktora eğitimim boyunca bilimsel kişiliğini örnek almaya çalıştığım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Recep ÇİBIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez projemi destekleyen T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ile Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü idarecilerine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlükleri aşmamda katkıları olan mesai arkadaşlarıma, Veteriner Hekim Dr. Rahşan AKPINAR'a, Veteriner Hekim Dr. Yunus KILIÇOĞLU'na, Veteriner Hekim Dr. Yüksel DURMAZ'a Veteriner Hekim Atanur TEZEL'e teşekkür ederim. Suş doğrulama çalışmalarında kullandığım primerleri gönderen ve deneyimlerini paylaştıran Veteriner Hekim Dr. Ediz Kağan ÖZGEN'e de teşekkürü bir borç bilirim. Dostluğu ve manevi desteklerinden dolayı Dr. Fatma Nur DAL'a ve Doç. Dr. Funda TERZİ'ye minnettarım.

Hayatım boyunca her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan ve her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim sevgili ailemin tüm fertlerine ve eşime müteşekkirim. Son olarak bu tez çalışmasını tamamlamayı lütfeden, Aziz ve Hakim olan Allah'a hamdeder, bu çalışmayı O'na ithaf ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimini Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 2007-2013 yılları arasında tamamlamıştır. 2013 yılında Emet/Kütahya'da Veteriner Hekim olarak memuriyete başlamıştır. 2014 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başlamıştır. Halen, 2016 yılında atandığı Samsun Veteriner Kontrol Enstitü'nde çalışmaktadır.

