T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARININ ÜRETTİĞİ BAZI BAKTERİYOSİNLERİN TANISI

YETER DELİBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-15071 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN–2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü MİKROBİYOLOJİ Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Programı çerçevesinde YETER DELİBAŞ tarafından hazırlanan "MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARININ ÜRETTİĞİ BAZI BAKTERİYOSİNLERİN TANISI" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2016

Üye	: Prof.Dr. Şükrü KIRKAN	ADÜ	.....
Üye(Tez Danışmanı):	Doç.Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	ADÜ	.....
Üye	: Yrd.Doç.Dr. Fulya OCAK	CBÜ	.....

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda; öncelikle danışmanıma; Araştırma laboratuvarlarında uzun uğraşlarda destek olan Anabilim Dalı'ndaki tüm Öğretim Üyeleri'ne teşekkür ederim.
Tez çalışmam esnasında desteklerini esirgemeyen aileme ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY i
TEŞEKKÜR..... ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
RESİMLER DİZİNİ vii
TABLOLAR DİZİNİ.....viii
ÖZET ix
ABSTRACT.....x
1. GİRİŞ.....1
2. GENEL BİLGİLER.....2
2.1. *Enterococcus faecium* 2
2.1.2. Ekolojisi.....3
2.1.3. Patolojisi 3
2.1.4. Biyoteknolojide Uygulama Alanları 4
2.1.5.Mevcut Araştırmalar 4
2.2.Bakteriyosin Nedir 5
2.2.1.Bakteriyosinlerin Tarihçesi 7
2.2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri 7
2.2.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması.....9
2.2.4. Gram pozitif bakteriler ile Gram negatif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karşılaştırılması 11
2.2.5. Probiyotik, Bakteriyosin ve Antibiyotik İlişkisi 12
2.2.6. Bakteriyosinlerin Günlük Yaşamdaki Yeri 14
2.2.6.1. Gıda Teknolojisinde Bakteriyosin Kullanımı 15
2.2.6.2. Patojen Baktyeriler İle İlgili Hastalıkların Tedavisinde.....16
2.2.6.3. Kanser Tedavisinde 16
2.2.7. Enterokoklar Tarafından Üretilen En Önemli Bakteriyosinler 17
2.2.7.1. Enterosin A ve B 17
2.2.7.2. Enterosin P 18

3. GEREÇ VE YÖNTEM 19
3.1. Gereç 19
3.1.1.Süt Örnekleri 19
3.1.2. Besiyerleri ve Solusyonlar 19
3.1.2.1. Besiyerleri 19
3.1.2.2. Solusyonlar 21
3.1.3. PZR 22
3.1.3.1.Kullanılan Cihazlar 22
3.1.3.2. $MgCl_2$, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set 23
3.1.3.3. Primerler 23
3.1.3.4. Agarose Jel Hazırlanışı 23
3.1.3.5. Marker 24
3.1.3.6. Etidium Bromür 24
3. 2. Yöntem 24
3. 2. 1. Süt Örneklerin Alınması 24
3.2.2. Enterokok İzolasyonu 24
3.2.3. Enterokok İdentifikasyonu 25
3.2.3.1. Katalaz Testi 25
3.2.3.2. %6,5 NaCl'de Büyüme 25
3.2.3.3. *E. faecium* suşlarının identifikasyonu 25
3.2.3.3.1. DNA İzolasyonu 26
3.2.3.3.2. DNA'nın Elektroforezi 26
3.2.3.3.3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri 26
3.2.4. PZR 27
3.2.4.1. *Enterococcus* sp. ve *E. faecium* PZR 27
3.2.4.2. Genotipik Bakteriyosin Tespiti 28
4. BULGULAR 30
4.1. İzolasyon 30
4.2. PZR 30
4.2.1. *Enterococcus* sp 30
4.2.2. *E. Faecium* 31
4.2.3. Genotipik Bakteriyosin Tespiti 32
4.2.3.1. *ent*A 32
4.2.3.2. *ent*B 32

4.2.3.3. *ent*P 33
5. TARTIŞMA 35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 40
EKLER 47
ÖZGEÇMİŞ 48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMPs : Antimikrobiyal Peptidler

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

Esp : Enterococcal Yüzey Proteini

ETEC : Entero Toksijenik *E. coli*

GRAS : Genellikle güvenli olarak kabul edilen

HNSCC : Boyun ve baş skuamöz hücre karsinoması

LAB : Laktik Asit Bakterileri

MRSA : Methicillin-dirençli *Staphylococcus aureus*

STEC : Shiga Toksijeni *E. coli*

USFD : ABD İlaç ve Gıda İdaresi

VRE : Vankomisin Dirençli Enterokok

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. LAB bakteriyosinlerinin yapılarının ve aksiyon modlarının gruplandırmada önemi……... 10
Resim 2. Bakteriyosin üreten suşlar ve saflaştırılmış bakteriyosinlerin yiyeceklerde ve hayvanlarda kullanımı…… 12
Resim 3. Bakteriyosin üretimi probiyotik fonksiyonelliği…….. 13
Resim 4. İzolatların selektif katı ve sıvı besiyerlerinde görünümü…… 30
Resim 5. *Enterococcus* sp. PZR elektrofroz görüntüsü…….. 31
Resim 6. *E. faecium* PZR elektroforez görüntüsü……..... 31
Resim 7. *E. faecium* sekans sonucu…….. 31
Resim 8. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*A) ……. 32
Resim 9. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*B) ……. 32
Resim 10. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*P) …..……. 33
Resim 11. *E. faecium* izolatların bakteriyosin yapısal genlerinin agaroz jel elektroforez görünümleri……..... 33
Resim 12. *E.faecium* izolatlarının taşıdığı virulens gen kombinasyonları…… 34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan primerlerler dizileri, amplikon uzunlukları, hedef genleri… 23
Tablo 2. Mastermiksin hazırlanma oranları……. 27
Tablo 3. *Enterococcus* spp. ve *E. faecium* PZR koşulları……... 28
Tablo 4. Enterosin yapısal genlerinin PZR koşulları…….. 28
Tablo 5. *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin genleri……... 34

ÖZET

MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECİUM* SUŞLARININ ÜRETTİĞİ BAZI BAKTERİYOSİNLERİN TANISI

Delibaş Y. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.

Bu çalışmada da mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının en önemli bakteriyosin genleri olan enterosin A, enterosin B ve enterosin P'yi taşıma potansiyellerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi amaçlandı. Çalışma materyalini 620 mastitisli sığırdan alınan süt örnekleri oluşturdu. Enterokok izolasyonu selektif besiyerinde klasik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Cins ve tür düzeyinde identifikasyon ile enterosin yapısal gen varlıklarını belirlemek için moleküler yöntemler kullanıldı. İzolasyon çalışmaları sonucunda 96 enterokok şüpheli suş elde edildi. Bunlardan *E. faecium* suşlarını belirlemek için spesifik primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında izolatların %13,5'unun *E. faecium* olduğu belirlendi. Bakteriyosin yapısal genlerinden *ent*A ve *ent*B genleri izolatların %30,8 'inde belirlenirken; *ent*P geni %7,7 oranında bulunuyordu. Sonuçlar bakteriyosin yapısal gen kombinasyonları yönünden değerlendirildiğinde ise iki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23,0 oranında *ent*A+*ent*B gen kombinasyou ikincisi ise %7,7 oranında *ent*A+*ent*B+*ent*P genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondu. Sonuç olarak bu çalışma, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip oldukları, bu suşların hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşma ve bulaştıklarında ise infeksiyon oluşturabilme potansiyellerinin olduğunu gösterdi. Gelecekte mastitisli sığır sütlerinden izole edilen diğer enterokoklarda bu genlerinin dağılımının bilinmesi ve bu bakteriyosinlerin endüstriyel potansiyellerinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecium*, sığır, mastitis, bakteriyosin, gen

ABSTRACT

DETECTION OF SOME BACTERIOCINS IN *ENTEROCOCCUS FAECİUM* STRAINS ISOLATED FROM MASTITIC BOVINE MILK

Delibaş Y. Adnan Menderes University, Health Sciences Institute Department of Microbiology, Master Thesis, Aydin, 2016.

The aim of this research is to identify the carrying potential of the most important bacteriocin genes of the strains of *Enterococcus faecium* obtained from mastitic bovine milk; enterocin A, enterocin B and enterorcin P, using a polymerase chain reaction (PZR). The working materials consisted of milk samples taken from 620 cattle infected with mastitis. Enterococci insulation was achieved using classic methods in selective broth. Molecular methods were used in order to conduct the identification of genus and species as well as the presence of enterocin structural genes. As a result of the research, 96 enterococci susceptible strains were obtained. Of these it was possible to acertain that of the isolates produced by PZR using a specific primer couple used to find *E. faecium* strains, 13.5% were *E. faecium.*Isolates of bacteriocin structural genes *ent*A and *ent*B were identified at 30.8%, the *ent*P gene was identified at 7.7%. When the findngs are evalutaed from the prospective of bacteriocin structural gene combinations, two gene combinations can be identified: Of these, the first is the combination of the *ent*A+*ent*B genes, found at the proportion of 23.0%, the second is the combination of the *ent*A+*ent*B+*ent*P genes found at the proportion of 7.7%. As a result, this study found that the strains of *E. faecium* istolated from mastitic bovine milk have a high pathogenicity potential, that these strains have the potential to pass from livestock and infect humans and create the potential to cause infection. It is believed that in order for the distribution of these genes in other enterococci isolated from mastitic bovine milk to be found and for the industrial potential of these bacteriocins to be utilised more research must be done within this area.

Keywords: *Enterococcus faecium,* cattle, bovine, mastitis, bacteriocin, gene

1. GİRİŞ

Bakteriyosinler bazı bakteriler tarafından sentezlenen küçük, ısıya dayanıklı peptidlerdir. Diğer bakterilere karşı etkindirler ve üretici bakteri kendi bakteriyosinine karşı spesifik bağışıklık mekanizmasına sahiptir. Bakteriyosinlerin, birçok bakteri tarafından sentezlendiği düşünülmektedir ve bunların çoğu henüz tanımlanmamıştır. Bunun nedeni, henüz çok az araştırmacının bunlar için araştırma yapmış olmasıdır. Bakteriyosinlerin aktiviteleri geniş veya dar spektrumlu olabilir, aynı türden veya farklı cinsten bakterileri hedef alabilirler. Genetik belirleyicileri kromozomal veya plazmid kökenli olabilir. Üretildikleri bakteriye yakın akraba olan türleri doğrudan etkiler. Mikroorganizmların gelişimlerini engellerler ve protein sentez mekanizmasını bozarlar. Antimikrobiyal etkileri ürettikleri organik asit, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal peptitlerden kaynaklanmaktadır. Antibiyotiklere karşı dirençli suş gelişimi çok sık görülürken, bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi nadirdir. Toksik değillerdir. Laktik asit bakterilerinden olan enterokokların önemli bakteriyosin sentezleyici bakterilerden oldukları bilinmektedir.

Bakteriyosin üreten enterokoklar gıdalardan, çöplerden, atık sulardan, farklı ruminantların rumen içerikleri ve hayvansal atıklardan izole edilmiştir. Bununla birlikte hayvansal kaynaklardan izole edilmiş olan enterokok izolatlarının özelliklerinin incelendiği çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda da enterokokların yalnızca fenotipik olarak bakteriyosin oluşturabilme kapasiteleri incelenmiş, gen düzeyinde bir inceleme yapılmamıştır. Bununla birlikte yurdumuzda mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *Enterococcus faecium* suşlarının bakteriyosin üretme kapasitelerinin incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre mevcut değildir. Bu çalışmada da mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının en önemli bakteriyosin genleri olan enterosin A, enterosin B ve enterosin P'yi taşıma potansiyellerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 15071 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Enterokoklar spor yapabilme yetenekleri olmayan fakültatif aneorobik mikroorganizmalardırlar. Hemen her türlü olumsuz çevre koşullarına örneğin yüksek sıcaklık (10-45°C), düşük pH (4.5-10) ve yüksek sodyum klorür konsantrasyonu tolerans gösterebilirler. Prokaryotlar yeniden kategorize edilirken 1984 yılında *Streptococcus faceium* olarak bilinen eneterokok *Enterococcus faecium* olarak isimlendirilmiştir (Schleifer ve Kilpper-Balz 1984). Enterokok türleri insanda dahil olmak üzere çok sayıda memeli hayvanın normal bağırsak florasında yaşarlar ve bunun sonucunda insanlar tarafından tüketilen su ve gıda maddelerine bulaşmış olan fekal kirlenmenin indikatörü olarak kullanılırlar. Bir enterokok olan *Enterococcus faecium* insan patojeni olup hastane ve ameliyat sonrası infeksiyonlarına, endokardite ve idrar yolları infeksiyonlarına neden olmaktadırlar. Hastane infeksiyonlarına yakalanan hastalar bir önceki şikayetin tedavisi sırasında tıbbi bir ortamda bu mikrobiyal infeksiyona maruz kalabilirler. Bu mikrobun normal yaşam alanı çok sayıda memeli hayvanın gastrointestinal sistemi olmakla beraber ağız içi ve vajinal kanalda da bulunabildiği gibi toprakta, kanalizasyon ve hastane ortamındaki her türlü yüzeyde uzun süre yaşamını sürdürebilir. İnsan bağırsak sisteminde ortak yaşayan iki enterokok türünden olan *Enterococcus faecalis* (%90-95) ve *Enterococcus faecium* (% 5-10) oranlarında bağırsak florasında yerlerini almaktadır (Huycke ve ark. 1998).

2. 1. *Enterococcus faecium*

E. faecium 10-40 ^{0}C arasındaki sıcaklığı tolere edebilen, asidik, izotonik ve hipertonik ortamlarda büyüyebilen bir mikroorganizmadır. *E. faecium* krebs döngüsü ve solunum zincirinden yoksun olduğu için enerjisini fermantsyonla sağlamaktadır. Hücre pilus ve flagellaya sahiptir (Huycke ve ark. 1998). Morfolojik olarak incelendiğinde Gram pozitif, tek veya çift zincirli görülebilen küresel etkenlerdir. Koloniler oluştururlar ve uzunlukları 1-2 mm olup ıslak görünümlüdürler. Hücreler kendiliğinden hareket etme yeteneğinde değillerdir. *E. faecium* ilaçlara karşı dirençli olup bu direnci plazmitlerden ve birleştirici transpozonlarla birlikte direnç kodlayan kromozomal genlerden elde edebilirler. Bazı suşları vankomisine, penisiline, gentamisine, tetrasikline, eritromisine ve teiokoplanine dirençlidir (Health Protection Agency

2007). *E. faceium* Gram pozitif olduğundan dolayı Gram pozitif hücreler kalın peptidoglikan tabakasının yanı sıra teikoik ve lipoteikoik asitlere sahiptirler. Bir kaç plazmitle birlikte halkasal DNA'ya da sahiptirler ve hücre konjugasyon yapma yeteneğine sahiptir. Konjugasyon sırasında hücreler sex feromonleri bırakır, agregasyon faktörleri salgılanır ve ayrıca da biofilm oluşturabilirler. Tüm bu özellikler konjugasyonun gerçekleşebilmesi, konjugasyon ile mikroorganizmanın yararına olan özelliklerinin kendi türüne aktarılabilmesi için gereklidir. *E. faceium'*un genetiksel yapısı 2.8Mbp olarak belirlenmiş olmasına rağmen bu proje halen devam etmektedir (Foulquie Moreno ve ark. 2006).

2. 1. 2. Ekolojisi

E. faecium ilaç direncini üç tip konjugasyon ile kazanır. Bunlar feromona duyarlı plazmitlerle, geniş-konakçı aralıklı plazmitlerle ve konjugatif plazmitlerledir. Feromona duyarlı plazmitlerin oluşumu hücrenin spesifik plazmit için sex feromoni salgılaması ile başlar. Donör hücre feromon ile ilişkiye geçtiğinde transkripsiyon için uygun plazmit parçası uyarılır ve donör tarafından yapışkan özelliğinde maddeler salgılanır. Yapışkan özelliğindeki bu madde transfer edilecek plazmitin alıcıya geçmesini ve iki hücrenin birbirlerine yapışmasını sağlayarak konjugasyonda çok önemli görevi de yerine getirmiş olur. Plazmitlerin transferi farklı cins bakteriler arasında olabildiği gibi bunların arasında stafilokok ve streptokoklarda vardır. *E. faecium'*un yaygın olarak geniş konakçılı plazmitlere sahip olmasının sonucu ilaçlara karşı direnç gösterme özelliği geniş alanlara kolaylıkla yayılabilmektedir. Konjugatif transpozonlar cinsler arasında antibiyotik direnci transfer edebildikleri gibi Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında da yapabilmektedir. Bu yeteneğe sahip olan mikroorganizmaların bakteri kromozomuna ve kendilerini plazmit içine eklemelerine ihtiyaçları yoktur. *E. faecium* diğer bakterilere ilaç direncini aktarırken bu yeteneklerinden dolayı konjugasyonu çok iyi kullanmaktadır (Clewell ve Gawron-Burke 1986).

2. 1. 3. Patolojisi

E. faceium süper bug (antibiyotik dirençli mikroorganizma) olarak kabul edilir. Bu süper bug vücudun çok sayıda organlarını, deriyi, gastrointestinal sistemi kolonize eder. Cansız

nesnelerde de uzun süre canlı kalabilir. Bunun yanısıra multi-drug direnci karekterinden dolayı da özellikle kötü bir patojendir. *E. faecium* 'un en önemli virulens faktörlerinden birisi enterokokkal yüzey proteini olan *Esp*'dir. Bu protein bakterinin yapışmasını ve biofilm yapmasına izin verir. *Esp* genine sahip olan suşlar normalde klinik izolatlarda bulunurken bağırsakları koloni eden suşlarda bu protein bulunmaz. Biofilm formasyonu kan nakillerinde ve sonda borularında kolonizasyona neden olur ki bu da kanda ve idrar yollarında infeksiyona yol açabilir. *Esp* geni ekspresyonu sıcaklığın yükselmesi ve aneorobik koşullarda değişiklik gibi fiziksel koşullarda yükselebilir. Bu yolla *Esp*'nin regulasyonu *E. faecium'*un bir konağa girdiğinde tepkisini değiştirmesine izin verir (Heikens ve ark. 2007).

2. 1. 4. Biyoteknolojide Uygulama Alanları

E. faecium antibakteriyal peptidler üretir ve üretilen bu bileşikler bakteriyosin olarak adlandırılır. Bu mikrop peynir ve sebze gibi yiyecekleri fermente etmekte kullanılır ve istenmeyen mikropların üremesini engellemek için başlangıç kültürüne uygulanır. *E. faecium* hoş kokulu bileşikleri sentezleme gibi özellikleri nedeniyle bazı fermente et ve süt ürünlerini olgunlaştırmada diğer LAB ile de starter kültür olarak kullanılırlar. *E. faecium* bağırsak siteminde yaşayan zararları bakterilerle savaşmak için probiyotik olarakta kullanılır. Ancak tüm bunlar olurken bazı araştırmacılar enterekok cinsi bakterilerin GRAS (genel olarak güvenli oldukları kabul edilen) olarak kabul edilmemiş olmasından dolayı gıdalar da hiç bir şekilde kullanımını istememektedirler. Yine antibiyotiğe dirençli bazı suşların gıdalardan izole edilmesinin bu dirençli suşların gıda zincirine girebileceği endişesini de araştırmacılar kaygıyla izlemektedir (Kang ve Lee 2005).

2. 1. 5. Mevcut Araştırmalar

Yapılan bir çalışmaya göre *E. faecium* metabolizması ökaryot hücre metabolizmasından geçerek ökaryot hücre DNA'sına zarar verebilir. Oksidasyonu sırasında hücre zarına bağlı demethyl menaquinon yardımıyla *E. faecium* süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri üretir. Özellikle ürettikleri radikaller dikkate alındığında bu oksidantlar kromozal değişime yol açarak poliplere ve kolon kanserine neden olabilir. *E. faecium'*dan alınan hidrojen peroksit

farelerin kolon luminal hücrelerine zarar verdiği ortaya çıkarılmış ve bu da *E. faecium'* un karsinojenik potansiyelinin olduğunu göstermiştir. *E. faecium*'un vankomisine dirençli oluşu sağlık kurumlarının bu mikropla savaşmakta yenilikçi stratejiler bulmaları zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu yüzden doktorlar sıklıkla bilinmeyen yöntem ve tekniklere başvurmak zorunda kalırlar (Huycke ve ark. 2002).

2. 2. Bakteriyosin Nedir?

Mikroorganizmalar, olağanüstü bir biçimde mikrobiyal savunma sistemi geliştirebilirler. Hayvanlar, bitkiler, böcekler ve bakteriler tarafından çok sayıda antibakteriyal madde salgılanır ki bunlar hidrojen peroksit, yağ asitleri, organik asitler, ethanol, antibiyotikler ve bakteriyosinlerdir. Bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal peptidler (AMPs) veya proteinler bakteriyosinler olarak katagorize edilirler. Bakterilerin %99'dan fazlası en az bir bakteriyosin üretir ancak birçoğu halen daha tanımlanamamıştır. Bakteriyosinlerin öldürme kabiliyetleri, popülasyonlarının sürdürülebilirliği, diğer rekabetçilerin sayılarının azaltılması, besin ve yaşam alanlarının daha çok artırılması için bir savunma stratejisi olarak düşünülebilir. Bakteriyosinler, antibiyotiklerin aksine ribozomal olarak sentezlenen, proteazlara duyarlı ve genellikle insan vücuduna ve bulundukları ortama zarar vermeyen doğal bileşiklerdir (Riley ve Wertz 2002). Bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen inhibe etme yeteneği olan antibakteriyal maddelerdir. Gıdalarda patojen olan ve aynı zamanda gıdaların bozulmasına neden olan, etken mikroorganizmaların büyümesini önleyen veya ortadan kaldıran inhibe edici bileşiklerdir. Bakteriyosinler üretici olmayan bakterilerin protein sentez mekanizmasını bozarak gelişimlerini engellerken aynı zamanda da inhibitör üretemeyen ve aynı ortamda yaşayan diğer mikroorganizmaların çevre etkenlerini değiştirerek bunların ölümüne neden olmakta veya gelişimlerini engellemektedirler. Bunu yaparken muhtemelen bakteriyosin üretmeyen mikroorganizmalar üzerinde rekabet açısından bir üstünlük sağlayarak hayatta kalma şanslarını artırmaktadırlar (Franz ve ark. 2007). Antibiyotiklere karşı dirençli suş oluşumu çok sık görülmesine rağmen, bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi oldukça nadirdir. Toksik değillerdir; renksiz, tatsız, kokusuzdurlar. Bakteriyosinler, veterinerlik ve tıp alanlarında doğal antibiyotik ve hastalıkları tedavi edici olarak kullanılırken gıda sektöründe de biyokoruyucu özelliğinden dolayı tercih edilmektedir (De Vuyst ve Vandamme 1994).

Bakteriyosinler; insan, hayvan ve bitki patojenlerine karşı doğal olarak mücadele eden, büyük ölçüde yıkılabilen proteinlerdir ve insan hücrelerine herhangi bir zararı olmadığı bildirilmektedir. Birçoğu ısı stabilitesine sahip olup, asidik gıdalarda aktivite gösterebilmekte ve sindirim sistemi orijinli proteolitik enzimlerle parçalanabilmektedir. Bakteriyosinler geniş bir kullanım alanına sahiptirler ve doğada yaygın halde bulunurlar. Son yıllarda bakteriyosinlerin insan ve hayvan sağlığının iyileştirilmesinde, beslenmede kullanımı hedeflenmektedir (Cleveland ve ark. 2001, Gillor ve ark. 2005).

Bakteriyosin üretimi ile ilgili üzerinde en çok çalışılmış mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar, üretici mikroorganizma ile yakından ilgili suşlara karşı inhibitör etkinliği olan bakterioyosinler ya da özellikle enterosinler olarak isimlendirilen antimikrobiyal peptidler üretebilir (Poeta ve ark. 2008). Bakteriyosin üretiminin, aynı yerde bulunan ve bakteriyosin üretmeyip, üretilen bakteriyosine duyarlı olan suşlara karşı, onu üreten suşa avantaj sağlayan bakteri savunma mekanizmalarından birisi olduğu varsayılmaktadır. Enterokokların ürettiği enterosinlerin kullanımı, sucuk fermentasyonunda ve dilimlenmiş vakum paketli pişmiş et ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'in gelişiminin ve laktik asit bakterileri tarafından üründe slaym tabaka oluşumunun önlenmesinde ek koruma yöntemi olarak yarar sağlamaktadır. Enterosinler ve bakteriyosin oluşturma özelliğindeki enterokoklar geleneksel kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilmektedir (Franz ve ark. 2007). Bakteriyosinler dar veya geniş konakçı aralıklar ile bakteriyel olarak üretilmiş antimikrobiyal peptidlerdir. Bakteriyosinlerin çoğu gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilen bir feremondur. Gıda bilimcilerine yiyeceklerde bulunan özel bakteri türlerinin üremesini yönetmek ve engellemek için bakteriyosinler geniş çapta olanak sunarlar. Bu özellikle gıdaların korunması veya gıda güvenliği uygulamalarında yararlı olabilir. Aynı zamanda fermente olmuş gıdalarda istenilen floranın üremesi için uygulanabilir. Bu anlamda, bakteriyosinler gıda maddelerine doğal bağışıklığın bir ilkel şeklini vermek için kullanılabilir (Cleveland ve ark. 2001).

2. 2. 1. Bakteriyosinlerin Tarihçesi

Bakteriyosinler, ilk kez 1925 yılında Andrea Grantia tarafından keşfedilmiş olup farklı bakteri türlerinin genetik yapısında yer alan ve ribozomlar tarafından sentezlenen peptid yapısındaki antimikrobiyal bileşiklerdir. Grantia gözlemleri sırasında bazı *E. coli* suşlarının üremesinin antibakteriyal bileşikler tarafından engellendiğini görüp bunları kolisn V olarak adlandırmıştır. Bu çalışmaların ışığında yapılan diğer çalışmalar sonucunda yaklaşık 17 kolisinin farklı *E. coli* türleri tarafından üretildiği de bulunmuştur. Bakteriyosinler, küçük katyonik zar-aktif bileşikler olup hedef hücre içerisinde gözenek oluşturarak hücre zarı potansiyelini engelleyerek hücre ölümüne neden olurlar. Küçük katyonik peptidlerin antimikrobiyal etkisi bakterinin savunma mekanizması olup bu etki sadece bakterilerde değil bitkilerde ve hayvanlarda da vardır. Örneğin magainins, cecropins ve defensis hayvanlarda bulunan antimikrobiyal peptidler iken thionins bitkisel antimikrobiyal peptidlerdir. Bakteriyosinin tanımı keşfinden çok sonraları, 1953 yılında Jakob ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu tanım, farklı türler arasındaki antagonostik ilişkiler ve kolisin proteinleri gibi dar bir kapsam alanındaydı. Daha sonraları kolisin benzeri çok fazla madde bulununca bu tanımın kapsamı genişletilmiştir. Farklı bakteri türleri arasındaki antagonostik ilişkiler aslında 1877 yılında Pasteur ve Joubert tarafından ortaya atılmıştır. İdrarda bulunan bazı bakterilerin *Bacillus anthracis'*e karşı inhibitör etki yaptıklarını ortaya koymuşlardır. 1976 yılında Tag ve ark. bakteriyosinlerle ilgili yeni bir tanım yaparken aslında daha önce yapılan tanımlardan çok farklı olmayan bir tanım yaparak bakteriyosinleri, duyarlı bakteriler üzerinde bakterisit etkisi yaratan, protein yapısında makromoleküller, olarak tanımlamışlardır. Yine 1988 yılında, Klaenhammer tarafından yapılan tanıma göre bakteriyosin genetik benzerliği yakın olan bakteri türlerini inhibe etme yetisi fazla olan protein yapılı protein kompleksleridir demiştir. Bakteriyosinlerin biyokimyasal özelliklerine, molekül ağrlıklarına, etki spektrumlarına, etki mekanizmalarına ve genetik dayanaklıklarına bakıldığında büyük heterojen bir sınıf oluşturdukları görülmektedir (Klaenhammer 1993).

2. 2. 2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Bakteriyosinler küçük peptidler olup antibakteriyal özelliklere sahiptirler. Bakteriyosinler hem Gram pozitif (*Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc,*

Pediococcus, Propionibacterium) hem de Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli, Shigella* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp.) tarafından üretilir (Cintas ve ark. 1998, Nes ve ark. 2007).

Şimdiye kadar bir kaç yüz bakteriyosin tanımlanmıştır. Bakteriyosinlerin sınıflandırlması yapılmış olmasına rağmen amino asit dizisi, yapısı ve metabolik davranışları açısından bakıldığında sınıflandırılmaları bu özelliklerde görülen değişikliklerden dolayı halen devam etmektedir. Bakteriyosinler moleküler ağırlıkları düşük olan peptidlerdir ve üretici türlerle akrabalık ilişkisi olan türleri hedef almaktadır. (Casaus ve ark. 1997, Cintas ve ark. 1998).

Bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler tarafından üretilmekle beraber son yıllarda bakteriyosinlerle yapılan çalışmalarda Arkebakteri türlerininde bakteriyosin ürettikleri görülmüştür. Halojen arkeler tarafından sentezlenen halosinin diğer bakteriyosinlerle karşılaştırılması yapıldığında hiç bir şekilde dizi benzerliği görülmezken, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen spyosinin**,** *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisinlerin bir kısmının, *Enterobacter cloacae* tarafından üretilen kloasinin, *Klebsiella pneumonia* tarafından üretilen klebsin *ve Serratia marcescens* tarafından üretilen marcesinin protein dizi analizlerinin karşılaştırılması sonucunda ortak atadan evrimleştikleri saptanmıştır (Riley ve Wertz 2002).

Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler de mevcut olup mikrosinler olarak adlandırılır. Mikrosinler protein büyüklükleri, mikrobiyal hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemleri bakımından kendi içlerinde de farklılık göstermektedir. Örneğin kolisin V gibi mikrosinler sadece doğal amino asitler içerirken (modifiye olmayan), mikrosin B17 ve mikrosin C7 pek çok modifikasyona uğrarlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda 21 amino asit büyüklüğünde bir peptit olan ve translasyon sonrası modifikasyon yolu ile olgunlaştırılan yeni bir mikrosin (mikrosin J25) tanımlanmıştır. Mikrosin J25, 58 amino asitlik büyük bir öncü peptit halinde sentezlenir. Ardından 37 amino asitlik öncü peptit proteolitik olarak yapıdan uzaklaştırılarak 21 amino asitlik aktif peptitin halka yapısı oluşturulur. Hangi mekanizmalar ile bu basamakların gerçekleştiği ve halka yapısının oluşmasını yöneten sinyaller henüz tanımlanamamıştır (Gouaux 1997).

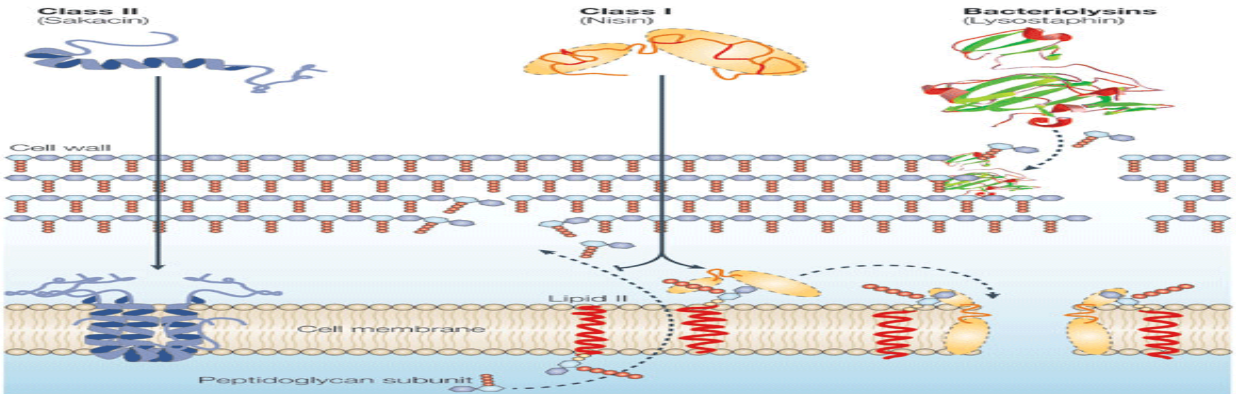
Gram negatif bakterilerden izole edilen pek çok bakteriyosinin, mevcut olan bakteriyosinler arasında meydana gelen rekombinasyonlar sonucu oluştuğu belirlenmiştir. Bu rekombinasyonların sıklıkla meydana gelmesi bakteriyosin proteinlerinin domain (bölge farklılaşması) yapısından dolayı kolaylaşmaktadır. Kolisinlerde merkezi domain, protein yapısının % 50' sini kapsamaktadır ve spesifik hücre yüzey proteinlerinin tanınmasında rol alır (Hammami ve ark. 2007).

2. 2. 3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

En iyi çalışılmış bakteriyosin grubu, gıda korunmasında kullanım potansiyellerinden dolayı laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Klaenhammer (1993) yılında LAB tarafından üretilen bu bakteriyosinleri; moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerinin olup olmayışı ve etki mekanizmalarını esas alarak 4 grup altında sınıflandırmıştır.

Sınıf I bakteriyosinleri veya Iantibiyotikler olarak bilinen bu bakteriyosinler sürekli post-translasyon modifikasyona uğrayan küçük, ribozomal sentezlenen peptitlerdir. Bunlar dehidrasyon sentezi sonucu oluşan amino asitleri ve Iantiyonin ve β-metil Iantiyonin kalıntıları içerir. Bu sınıfın en karekteristik bakteriyosini nisindir.

Sınıf II bakteriyosinleri küçük (4-6 kDa), ısıya dayanıklı, ribozomal olarak sentezlenen ancak hücre dışına taşınması sırasında bir lider peptidin bölünmesi haricinde post-translasyon modifikasyonuna uğramayan bakteriyosinlerdir. Sınıf II bakteriyosinleri büyük alt grupları içerir. Katı antilisterial aktivitelerinden dolayı tıbbi uygulamaların yanı sıra gıdaların korunmasında da kullanılırlar. Bir LAB bakteriyosini olan nisin çift aksiyon modu gösterir (Resim 1.). Sitoplazmadan hücre duvarına kadar olan peptidoglikan alt birimlerinin ana taşıyıcısı olan lipid II'ye bağlanarak hücre duvarı sentezini önleyerek hücre ölümüne neden olur. Dahası bu grup bakteriyosinler lipid II'yi hücre zarına yerleştirerek orada deliklerin açılmasına ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne yol açmaktadırlar. Genellikle Sınıf II bakteriyosinleri amfifilik sarmal yapıya sahip olup bu özelliklerinden dolayı hedef hücrelerin zarına yerleşerek bu hücrelerde depolarizasyona ve ölüme yol açar.



Resim 1. LAB bakteriyosinlerinin yapılarının ve aksiyon modlarının gruplandırmada önemi

LAB bakteriyosinleri gruplandırılırken yapılarına göre gruplandırılmalarının yanı sıra aksiyon modlarına göre de gruplandırılırlar. LAB bakteriyosinleri gruplandırılırken yapılarına göre gruplandırılmalarının yanı sıra aksiyon modlarına göre de gruplandırılırlar (Cotter ve ark. 2013). Bu bakteriyosinler öncü peptidler olarak sentezlenir ve 14-30 amino asitten oluşan bir lider sekansı içerir. Sınıf II bakteriyosinlere Klaenhammer'in sınıflandırmasına ek olarak Nes ve ark. (1996) Sınıf II bakteriyosinleri yeniden gruplandırmış ve bu gruba üç alt grup eklenmiştir. Bunlar; Sınıf IIa, IIb ve IIc'dir. Ancak sınıf IIa ve IIb de bir değişiklik yapmazken sınıf IIc'ye hücreden genel translokaz yoluyla sentezlenen tipik signal peptidini içeren yeni bir bakteriyosin eklemiştir (Economou 1998).

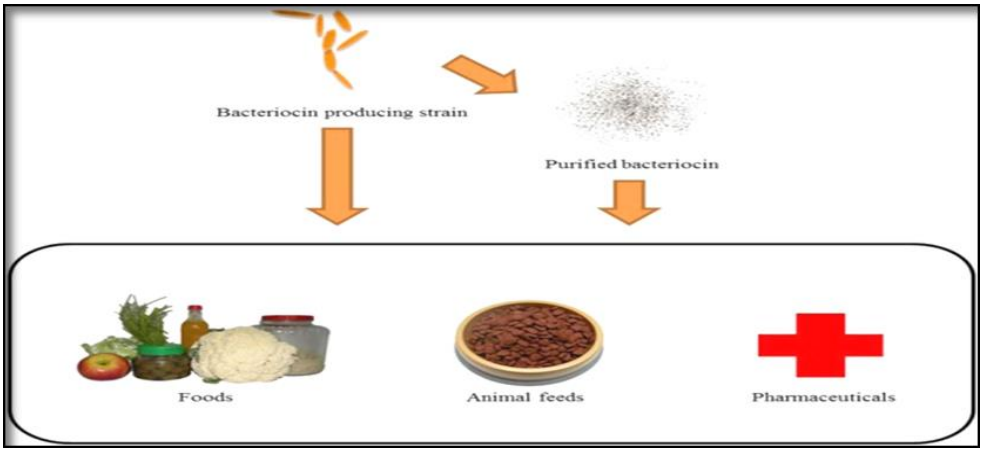
Sınıf III bakteriyosinleri ısıya dayanıksız, peptidik antibiyotikler içeren ve moleküler ağırlıkları 30 kDa olan protein yapılı bileşiklerdir. Bu grup bakteriyosinlerin çoğu *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretilmektedir. Bu grubun üyeleri *L. helveticus* tarafından üretilen helvesitin J ve *L. acidophilus* tarfından üretilen laktindir (Oscariz ve Pissabarro 2001).

Sınıf IV bakteriyosinleri karmaşık bakteriyosinler olarak tanımlanır, yapılarında glikoprotein (laktosin 27) veya lipoprotein (lakstrepsins) yarımları içerir ki bu özellikleri bu grup bakterilerin aktiviteleri için protein olmayan yarımlara ihtiyaç duyduğunu gösterir (Oscariz ve Pissabarro 2001). Bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında kullanılan bazı kriterler enterosinlere uygulandığında yanıltıcı olabilir. Örnek olarak iki-peptidli bakteriyosinler farklı sınıflarda bulunabilir. Her ne kadar iki peptidler genelikle sinerjistik olarak etki etsede bazı durumlarda bileşenlerin her biri kendilerine özgü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Garneau ve ark. 2002).

Disülfid köprüleri farklı bakteriyosinlerde bulunabilir ve muhtemelen birinci sıra konumlarına bağlı olarak farklı bakteriyosin yapılarını stabilize edebilirler. Bakteriyosinlerin daha doğal sınıflandırılması için sekans benzerlikleri ve post-translasyonel modifikasyon türü ana kriter olarak alınarak bakteriyosinlerin akrabalık dereceleri ilişkilendirilmiştir (Oscáriz ve Pisabarro 2001).

2. 2. 4. Gram pozitif bakteriler ile Gram negatif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karşılaştırılması

Gram pozitif bakteriler de, Gram negatif bakteriler gibi birçok farklı bakteriyosin üretmektedir. Ancak bu gruba dahil olan bakteriyosinler Gram negatif bakterilerin bakteriyosinlerinden temelde farklılık gösterirler. Gram pozitif bakterilerde bakteriyosinin salınmasından sorumlu transport mekanizması, Gram negatif bakterilerin mekanizması ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bazı bakteri grupları bakteriyosin transportu için spesifik sistemler geliştirmiş iken, bazıları sadece salgı-bağımlı salınım yolunu kullanmaktadır. Sonuç olarak Gram pozitif bakteriler bakteriyosinlere özgü regülasyonlara sahipken, Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri yalnız konakçı regülasyon sistemlerini kullanmaktadır. Gram pozitif bakterilerde bakteriyosin üretimi, genellikle logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında gerçekleşmektedir. Nisin üretimi logaritmik fazın ortalarında başlar ve hücrenin durağan faza girmesi ile en yüksek düzeye ulaşır. Ekspresyonun yoğunluğu hücre döngüsüne değil, kültür yoğunluğuna bağlıdır (Hammami ve ark. 2007). Bakteriyosin üreten suşlar ve saflaştırılmış bakteriyosinler yiyeyeceklerde hayvanlarda ve ilaçlarda kullanılabilir (Anonim 1).



Resim 2. Bakteriyosin üreten suşlar ve saflaştırılmış bakteriyosinlerin yiyeceklerde ve hayvanlarda kullanımı

2. 2. 5. Probiyotik, Bakteriyosin ve Antibiyotik İlişkisi

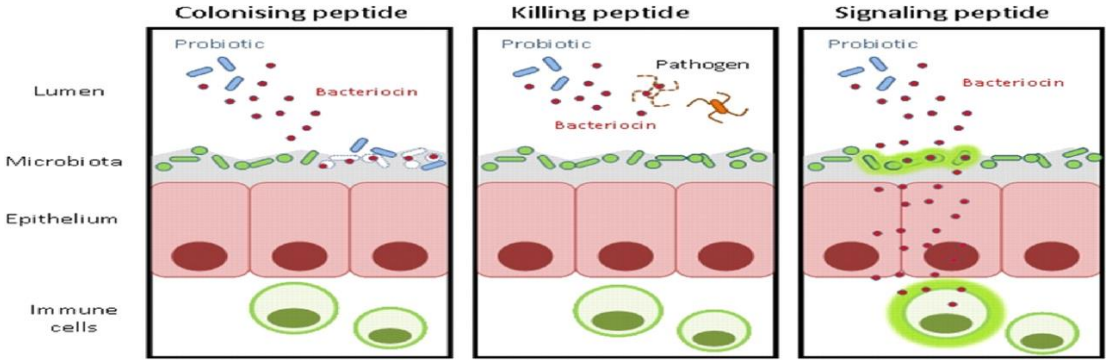
Probiyotik kelimesi yunancadan türetilmiş olup bio "yaşam" veya "yaşama destek" anlamına gelir ki ilk defa Lilly ve Stillwell tarafından 1965 yılında kullanılmıştır. Probiyotikler genellikle bağırsak mikrobiyal dengesini teşvik etmek ve sağlık yararlarını artırmak için kabul edilen doğal bileşiklerdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) probiyotiği canlı organizmalar olarak tanımlar ve yeterli ve dengeli miktarlarda uygulandığında konağın sağlığı açısından yararlı olduğunu söyler (Dobson ve ark. 2012). Probiyotiklerin yararlı olabilmesi için şu özellikleri içermeleri gereklidir; probiyotik özelliğe sahip suşlar kararlı bir şekilde hayatta kalmalı, bağırsak ortamında metabolik etkinliğe sahip olmalı, non-patojenik ve non-toksik olmalı, konak hayvana yarar sağlamalı ve yaşamını sürdürebilmelidir. Bağırsak patojenlerini kontrol etme de probiyotikler birçok yol kullanır. Probiyotiklerin antimikrobiyal maddeleri üretme, besin için rekabet etme, bağışıklık sistemini modüle etme ve patojenleri bağlama yetenekleri vardır (FAO/ WHO 2001).

Bakteriyosin, kısa zincirli yağ asitleri ve hidrojen peroksit gibi birçok antibakteriyal maddeler probiyotikler tarafından üretilir ve mide-bağırsak mikroorganizmalarını ve patojenlerini inhibe ederler (Dobson ve ark. 2012). Dobson ve arkadaşları (2012) bakteriyosinlerin probiyotik özelliklerinden biri olduğunu düşünmektedirler. Şu anda pek çok probiyotik LAB, patojenik

olmayan *E. coli*, basil ve mayalar günlük hayatta kullanılmaktadır. Fare, tavuk ve domuz gibi hayvan modellerinde saf bakteriyosinler veya bakteriyosin üreten probiyotikler patojenlerin sayısını azaltabilir veya bağırsak mikrobiya bileşimini değiştirebilir. Bernbom ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada dışkılarında *Bifidobacterium* bulunan sıçanlar 8 gün boyunca (dereceli bir şekilde artırılarak) nisin üreten ve üretmeyen *Lactococcus lactis* suşu ile beslenmiş ve bunun sonucunda sıçanların kalın bağırsaklarında, ince bağırsaklarında, sekum ve kolonda enterokok/streptokok mikroorganizmalarının sayısında düşüş olduğunu bulmuşlardır.

Son yıllarda insan ve hayvan hastalıklarında klasik antibiyotiklerin kullanımı, bakteriyal antibiyotik direnci problemini yaratmıştır. Bunun bir sonucu olarak çok sayıda dirençli suş ortaya çıkmış ve antibiyotiklerin patojenlerde sınırlı kullanımı nedeniyle antibiyotikler hastalık yapan patojenlerde yetersiz kalmaya başlayınca tıp ve diğer sağlık alanlarında yeni mikrobiyal ajanların bulunmasının önemi iyice artmıştır.

Gıda ve yem ürünlerinde kötüye kullanımını kontrol etmek için insan uygulamalarında antibiyotik yerine makul bir alternatif olan bazı bakterilerin ürettiği peptid yapısında olan antimikrobiyal maddeler önem kazanmaya başladı. Bunların arasında bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri önemli ölçüde dikkat çekmeye başladı ve bunlar nanomolar aralığında aktiftir ve hiç bir toksisite etkisi yaratmazlar. Bakteriyosinler ribozomal sentezlenen proteinli bileşikler olup üretene değil üretemeyen yakın türlere öldürücüdür (Cotter ve ark. 2013). Bakteriyosinlerin doğal bağışıklık sisteminin silahı olarak fonsiyon gösterdikleri bildirilmektedir (Anonim 1).



Resim 3. Bakteriyosin üretimi probiyotik fonksiyonelliği

Bakteriyosin üretimi, probiyotik fonksiyonelliğine katkıda bulunabilir. Bakteriyosinler, peptidleri kolonize ederek, yerleşik mikrobiatalarla probiyotik rekabeti kolaylaştırarak, ölüm

peptidleri gibi hareket ederek, patojenleri doğrudan ortadan kaldırarak, sinyalizasyon peptidleri gibi hareket ederek probiyotik olma özelliklerini bu yollarla sağlayabilir (Gillor ve ark. 2005). Bakteriyosigenik LAB kültürleri ve/veya onların bakteriyosinleri, biyokoruma sistemlerinde patojenleri kontrol etmek ve gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı yeni yaklaşımların gelişmesine katkıda bulunmuştur (Parada ve ark. 2007). Bazı LAB patojenlere ve gıdalarda bozulmaya neden olan organizmalarda antigonist etki göstermştir. Her ne kadar bakteriyosinler çok sayıdaki Gram pozitif ve Gram negatif bakteri tarafından salgılansa da güvenlik açısından yiyecek endüstrisinde LAB daha ilgi çekici olmuştur. Yüzyıllardır bakteriyal fermantasyon kolay bozulan yiyeceklerin besin değerlerini korumak ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerin dışında yiyecek ve içeceklerin korunması için kullanılan işlem geçirmiş veya kimyasal koruyucu kullanılan gıdalar sağlık konusunda hassas olan insanlarda bu tür gıdaları almama yönünde bir tavır geliştirmelerine yol açmıştır. LAB bakteriyosin üretimi rekabetçi ekolojik nişte bakterilerin hayatta kalması için avantaj sağlarlar. Bu nedenle gıdaların bozulmasına yol açan istenmeyen bakterileri kontrol etmek için LAB bakteriyosinleri koruyucu olarak gıda endüdtrisinde kullanılabilir ve böylece tüketiciler tarafından da kabul görür (Yang ve ark. 2014).

2. 2. 6. Bakteriyosinlerin Günlük Yaşamdaki Yeri

Bilinçli toplumlar yiyeceklerin güvenliği konusunda daha fazla duyarlıdırlar. Özellikle yiyeceklerde kullanılan kimyasal koruyucuların toksik etki yaratacağı endişesini uyandırmaktadır. Bundan dolayı gıdalarda koruyucu olarak doğal kaynakların kullanılmasının beslenme ve sağlık açısından faydalı olacağı düşünülmektedir. Kimyasal koruyucuları içermeyen organik besinler özellikle çok gelişmiş ülkelerde daha popüler olmaya başlamıştır. Ancak ticari olarak satın alınan kimyasal koruyucular ve antibiyotikler kimyasal sentez yolluyla üretildiklerinden dolayı bu tür gıdaların uzun süre tüketimi bağırsaklardaki iyi bakterilerin sayısının azalmasına bağlı olarak insan sağlığını etkilemektedir. Ayrıca antibiyotiklerin ve antibiyotik bileşenlerinin gıdalarda kullanımı yasal değildir. Kimyasal koruyucuların ve antibiyotiklerin aksine bakteriyosinler "genellikle güvenli olarak kabul edilir" (GRAS) özellikle de nisinin sebzelerde, süt ürünlerinde, etlerde ve diğer besinlerde kullanımı insan sağlığı açısından güvenlidir. Yiyeceklerin üretim sürecinde mikroorganizmalar kontaminasyonu inhibe

ederek üremelerini engeller (Settanni ve Corsetti 2008). Bakteriyosinler artık yaygın olarak gıda muhafaza süresini uzatmak için gıda biliminde (Ghrairi ve ark. 2012), hayvan hastalıklarının patojen infeksiyonu inhibe etmede (van Heel ve ark. 2011), ilaç endüstrisinde ve tıp toplumunda malignant kanserlerlerin tedavisinde kullanılır (Lancaster ve ark 2007). Bakteriyosinler doğal ürünler olarak kabul edilir çünkü onlar bakteriler tarafından üretilen peptidler ve proteinlerdir ve çok eski zamanlardan beri fermente yada fermente olmamış yiyeceklerde bulunurlar. Çok sayıda mikroorganizma özellikle bakteriyosin üreten LAB, lezzeti ve raf ömrünü artırmak için başlangıç kültürleri veya ko-kültürler olarak kullanılır. Buna ek olarak çok sayıda bakteriyosin üreten bakteriler yiyeceklerden ve çiğ malzemelerden izole edilirler (Settanni ve Corsetti 2008).

2. 2. 6. 1. Gıda Teknolojisinde Bakteriyosin Kullanımı

Raf ömrünü uzatmak, mikrobiyal üremeyi ve olası bozulmayı önlemek için antibiyotikler ve gıda koruyucuları (nitrit ve sülfür dioksit) gıdalara katılır. Ancak, çoğu ticari gıda koruyucuları kimyasal sentez yoluyla geliştirilmekte bundan dolayıda uzun süre kullanımı sonucunda da insan vücuduna zarar vermektedir. Bakteriyosinler doğal gıda koruyucularıdır. Bakteriyosinler proteazlara karşı duyarlı olduklarından fonksiyonel olmayan bu küçük peptidlerle ve amino asitlerle yüklenmiş olan gıdalar, sindirim sisteminden geçerken sindirilir (Cleveland ve ark. 2001). Bakteriyosin üreten bakterilerin varlığı eski zamanlara kadar dayanır ki yoğurt, peynir ve portekiz fermente eti gibi gıdalarda doğal gıda koruyucu olarak çok önceden yerini almıştır. Gıda teknolojisisnde *Lactococcus lactis* bakterisi tarafından üretilen nisin ilk antibakteriyel peptidtir (Rogers 1928). Nisin ticari bakteriyosin olup gıda koruyucusu olarak marketlerde Nisaplin® olarak satılır. Nisaplin® U.S. Food and Drug Administration (USFDA) tarafından gıdalarda koruyucu olarak kullanımı için onay verilmiş ve 45'den fazla ülkede de ruhsatlı olarak kullanılmaktadır. Diğer bir ticari olarak kullanılanılmaya uygun olan bakteriyosin pediosin PA-1 dir ve Alta® 2341 olarak pazarlanır ki et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* üremesini inhibe eder (Settanni ve Corsetti 2008).

2. 2. 6. 2. Patojen Baktyeriler İle İlgili Hastalıkların Tedavisinde

Alexander Fleming'in 1928 yılında ilk keşfedilen antibiyotik olan penisilinin keşfinden bu yana çok sayıda antibiyotik patojenlerin tedavisinde kullanılmıştır. USFD tarafından antibiyotikler ilk defa 1951 yılında onaylanmış ve hayvan yemlerinde kullanılmaya balnmıştır. Bu tarihten sonra da, bakteriyal infeksiyonlara bağlı hayvan ölümleri sayısında düşüş görülmüştür. Ancak antibiyotiklerin kötü kullanımı sonucu ortaya çıkan patojenlerde çoklu ilaç direnci problemi ciddi endişeleri de beraberinde getirmiştir (Joerger 2003). Bakteriyosinler, Shiga toxin üreten *E.coli* (STEC), enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) metisin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), VRE, *Agrobacterium* ve *Brenneria* sp. gibi önemli bitki ve hayvan patojenlerini inhibe edebilirler. Bakteriyosinlerin, bakterisit mekanizması bakterilein reseptör-bağlanma yüzeylerinde ve zar boyunca bulunur, bu da bakterilerde sitotoksiteye yol açar. Tüm bunlara ek olarak bakteriyosinler toksik derecesi düşük peptidler veya proteazlara duyarlı pepsin ve tripsin gibi proteinlerdir (Cleveland ve ark 2001).

2. 2. 6. 3. Kanser Tedavisinde

Son yarım yüzyıl boyunca kanser ciddi bir sorun olup, insan ve hayvan sağlığı için tehdit haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün bildirdiğine göre 8.2 milyon insan kanserden ölmüş ve 2012 yılında dünya çapında 14.1 milyon yeni kanser vakaları görültür. Dünya'da yıllık görülen kanser vakalarının % 60 'ı Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika'da bulunduğu bildirilmiştir. Dünyada ki en büyük ölüm nedenlerinden biri olan kanser 10. sırada yer almaktadır. 2011 yılında Dünya'da öldürücü faktör olarak %2.7 ile akciğer kanseri yedinci sırada yer (Siegel ve ark 2013).

Kanser tedavisinde bazı araştırmacılar bakteriyosinlerin tümorlü hücrelere karşı aktivite gösterdiklerine işaret etmektedir. Bakteriyosinlerin doğal ve yasal oldukları düşünüldüğünde besinlere katılan bakteriyosinlerin potansiyel ilaç karşıtı olabilecekleri düşünülebilir. Bazı bakteriyosinler, insanlarda standart fibroblast dizisi MRC5 ve 11 insan tümör hücrelerinin büyümelerine por oluşumuna neden olan kolisin A ve E1 'nin engellediği görülmüştür. Bunun aksine por oluşumuna neden olan kolisin U ve RNA az aktive kolisin E3 aynı inhibe etksini

göstermemiştir (Chumchalová ve Smarda 2003). Sağlıklı 160 kişinin 102'sinin dışkısında (%63.8) bakteriosin üreten *E. coli* görülmüş ve bakteriler tarafından üretilen kolisinlerin insan kolerektal karsinomayı azaltan bir faktör olabileceği ihtimalini öne çıkarmıştır. Kolisinler anti-kanser ilaçları olacak kadar ılımlı potansiyele sahiptirler. Bakteriyosin üreten probiyotikler kanser oluşumlarını önlemek için kullanılacak başka bir yol olabilir.

2. 2. 7. Enterokoklar Tarafından Üretilen En Önemli Bakteriyosinler

Bakteriyosin üretimi ile ilgili üzerinde en çok çalışılmış mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar, üretici mo ile yakından ilgili suşlara karşı inhibitör etkinliği olan bakterioyosinler ya da özellikle enterosinler olarak isimlendirilen antimikrobiyal peptidler üretebilir. Enterokoklar tarafından üretilen pek çok bakteriyosin bulunmakla birlikte; bunlardan en önemlileri Enterosin A, B ve P'dir (Franz ve ark. 1999).

2. 2. 7. 1. Enterosin A ve B

E. faceium suşu T136 iki bakteriyosin üretir. Bunlardan biri pediosin ailesinin bir üyesi olan enterosin A diğeri ise pediosin ailesine ait olmayan entrosin B dir. Ancak sekans benzerliklerinden dolayı enterosin B ve karnobakteriosin A'nın pediosin ailesiyle ilişkili olabileceği görüşü öne sürülmüştür. Enterosin A 4833 Da ağırlığa sahip sınıf IIa pediosin benzeri, Enterosin B pediosin benzeri olmayan sınıf IIc molekül ağırlığı 5462.2 Da bakteriyosindir (Casaus ve ark 1997). Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi, N-terminal amino asit sekanslaması ve kütle spektrometresi analizi yöntemleri ile enterosin A ve B homojenite edilerek saflaştırılmıştır. DNA dizilimi ve amino asitlerinin taranması sonucu enterosin A'nın birincil yapısı da belirlenmiştir. Enterosin A ve B sadece çok az farklı inhibitör spektruma sahiptirler ve her ikiside listeria, stafilokok ve test edilen birçok Gram pozitif bakteriye karşı aktiftitler. Hassas kültürler bu bakteriyosinlerden birine maruz bırakıldığında her ikisininde bakterisit faaliyetler gösterdiği ve hücreye her ikisinin karışımı eklendiğinde hayatta kalanların sayısının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Isıya dayanıklıdır. Bacteriyosin A ve B *Clostridium tyrobutyricum, C. sporogenes, Propionibacterium* spp., *L.monocytogenes* ve *S. aureus* gibi gıda kaynaklı bakteriler üzerine bakterisidal etki gösterirler (Casaus ve ark. 1997).

2. 2. 7. 2. Enterosin P

Enterosin P İspanya'da fermente edilip kurutulmuş sosisten izole edilmiş *E. faecium* P13 tarafından sentezlenen bir bakteriyosindir. Enterosin P' nin *L. monocytogenes, S. aureus, C. perfringens* ve C. *botulinum* gibi gıda kaynaklı bozulmalara neden olan patojenik Gram pozitif bakterileri inhibe ettikleri görülmüştür. Enterosin P özel bir besiyeri içerisinde 16 ile 45^0C arasında üretilir. Enterosin P 100^0C de 60 dk, 121^0C de 15 dk ısıya dayanıklıdır. 2.0 ile 11.0 arasındaki pH aralığına, maruz kaldığında bu aralıkta yaşamını sürdürebilir. Dondurup-çözülme tekniğiniyle uzun süreli saklanabilir. Bu bakteriyosin amonyum sülfat çökeltmesi, jel filtrasyonu, katyon-hidrofobik etkileşim ve ters faz sıvı kromatografisi ile saflaştırılabilmektedir. Bu bakteriyosin görünüşte 44 amino asitten oluşur ve 4.493 teorik bir moleküler ağırlığa sahiptir. Enterosin P güçlü antilisterial aktivite gösterir ve pediosin benzeri bakteriyosinler olarak bilinirler (Cintas ve ark 1998).

Şu anki bilgilerimize göre farklı kaynaklardan izole edilmiş olan enterokok suşlarının ürettikleri bakteriyosinlerin çeşitli özellikleri özellikleri incelenmiş olmasına rağmen; mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *Enterococcus faecium* suşlarınınn ürettikleri bakteriyosinler hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada da mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecium* izolatlarının, en önemli bakteriyosin yapısal genlerini (*ent*A, *ent*B, *ent*P) taşıma potansiyelleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereç

3. 1. 1. Süt Örnekleri

Çalışmada materyal olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda rutin teşhis amacı ile getirilmiş olan ve son iki yıl içerisinde saha çalışmaları esnasında toparlanan, hepsi laktasyon döneminde, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, 620 klinik veya subklinik mastitisli süt örneği kullanıldı.

3. 1. 2. Besiyerleri ve Solusyonlar

3. 1. 2. 1. Besiyerleri

Çalışmada süt örneklerinden enterokok türlerinin selektif izolasyonu amacıyla Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck) ve BBLTM Enterococcosel Agar (EA) (BD) kullanılırken; izole edilen mikroorganizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid), izolatların pasajlanmasında Kanlı Agar (BHIA) (Merck), saklanmalarında ise %20 gliserin içeren Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

3. 1. 2. 1. 1. Chromocult® Enterococci Broth

Peptone karışımı ……	8,6 g/L
NaCl ……	6,4 g/L
Sodium-azide…….	0,6 g/L
X-GLU……	0,04g/L
Tween 80……	2,2 g/L

Besiyeri 18,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözdürüldü. Beş ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarı renkli olup, pH 'sı 25°C 'da 7,5±0,2'dir. Besiyerinin bileşiminde bulunan sodyum azid özellikle Gram negatif bakterilerin gelişmesini baskılar. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucopyranoside (X-GLU)'in parçalanması özel peptonlar ile desteklenir. X-GLU'nun parçalanması sonunda oluşan mavi-yeşil renk oluşumu enterokoklar ve D grup streptokoklar için karakteristiktir.

3. 1. 2. 1. 2. Chromocult® Enterococci Agar (EA)

Pankreatik kazein……	17 g/L
Hayvansal pepton……	3 g/L
Maya Ekstraktı…….	5 g/L
Oxgall……	10 g/L
Eskulin…….	1 g/L
Sodium azide……	0,25g/L
Demir amonyum sitrat……	0,5 g/L
NaCl…….	5 g/L
Sodyum sitrat……..	1 g/L

Besiyeri 56 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldürüldü. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandı, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. Besiyeri 50ºC'ye kadar soğutulup petrilere döküldü. Besiyeri bileşimindeki fosfatlar, Tween 80 ve seçilmiş peptonlar enterokokların gelişimini destekler. Enterokoklar, besiyerindeki kromojenik substratları parçalayarak kolonilerin siyah-koyu kahverengi almasını sağlar. Bu da enterokokların kolayca saptanmasına sebep olur. Sodyum azid ve safra tuzları çoğu refakatçi mikroflorayı baskılar. Enterokok olmayan bakteriler şeffaf, beyaz-sarımsı renkte koloniler oluşturur bunlar enterokokların ürettiği siyah renkten kolayca ayrılırlar.

3. 1. 2. 1. 3. Kanlı Agar

Kanlı Agar……...	40 g/L

Besiyeri litrede 40 gr olacak şekilde çözdürüldü. pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. Sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

3. 1. 2. 1. 4. Brain Hearth Infusion Broth

BHIB……..... 37 g/L

Besiyeri litrede 37 gr olacak şekilde çözdürüldü. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı. 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3. 1. 2. 1. 5. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli)

BHIB……..... 3,7 g

Gliserin……. 20 ml

Distile su…… 80 ml

Besiyeri 100 ml.de 3,7 gr olacak şekilde çözdürüldü. pH' sı 7.2-7.4'e ayarlanıp, 500 µl miktarda ependorf tüplere dağıtıldı. 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3. 1. 2. 2. Solusyonlar

3. 1. 2. 2. 1. %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB)

NB…… 8 g/l

NaCl…… 6,5 g

Nutrient Broth'a %6,5 NaCl ilavesi yapılarak çözülmüş, 5 ml olarak tüplere dökülmüş, otoklavda steril edilmiş ve bu ortam, organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için kullanılmıştır (Atlas 2004).

3. 1. 2. 2. 2. %3'lük Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Ticari olarak temin edilen bu çözelti, organizmaların katalaz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

3. 1. 2. 2. 3. Gel Loading Buffer (6 X)

Bromofenol mavisi……. 25 mg

Sukroz …… 4 g

H_2O …… 10 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan tüm besiyerleri ve solüsyonlar kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

3. 1. 2. 2. 4. TAE Elektroforez Buffer

50x konsantrasyonda stok solusyon aşağıdaki gibi hazırlandı:

Tris Base……. 40 mM

Asetik Asit ……. 20 mM

EDTA …… …… 1 mM

Buffer solusyonu olarak stoktan 20 ml alınıp distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.

3. 1. 3. PZR

3. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PZR 96 örnek kapasiteli Boeco (Almanya) marka kademeli termal döngüleme cihazında elektroforez VWR marka 64 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

3. 1. 3. 2. $MgCl_2$, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM $MgCl_2$, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 100 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

3. 1. 3. 3. Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerlerin kullanım amaçları, dizileri, amplikon uzunlukları, hedef genleri, kaynakları ve Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan primerlerler dizileri, amplikon uzunlukları, hedef genleri

Primer	**Sekans (5'-3')**	**Amplikon uzunluğu (bp)**	**Hedef Gen**	**Kaynak**
Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	*tuf*	Ke ve ark. 1999
FAC11 FAC21	GAGTAAATCACTGAACGA CGCTGATGGTATCGATTCAT	1.091	*ddl* $_{E.faecium}$	Vilela ve ark. 2006
*ent*P	GCTACGCGTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	Enterocin P	Cintas ve ark. 1997
*ent*A	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	Enterocin A	De Vuyst ve ark. 2003
*ent*B	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	Enterocin B	De Vuyst ve ark. 2003

3. 1. 3. 4. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)……. 1 ve 1,5 g

TAE (0,5 X)…… 100 ml

İhtiyaca göre hazırlanan buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatıldı. Karışım, 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucularını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3. 1. 3. 5. Marker

Marker olarak 50 ve 100 bp (Fermentas marka) DNA Ladder kullanıldı.

3. 1. 3. 6. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1'lik ethidium bromür 500 ml 0,5X TAE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Süt Örneklerin Alınması

Çalışmada laboratuvara soğuk zincir altında getirilmiş olan 620 süt örneği kullanıldı. Süt örnekleri Veteriner Hekim'ler tarafından daha önce bildirildiği şekilde alındı (Baştan 2002). Bunun için, her meme lobu öncelikle su ile yıkanıp kurulandıktan sonra %70'lik alkol ile silindi. Eller sabunlandıktan sonra eldiven giyildi. Meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak amacı ile ilk birkaç ml süt boşa sağılıp steril enjektörler içine en az 3-5 ml miktarda süt alındı.

3. 2. 2. Enterokok İzolasyonu

Laboratuvara getirilen süt örnekleri, öncelikle selektif sıvı besiyerine olan Enterokok M Buyyon'a 100 µl inokule edildiler. Buyyonlar aerobik koşullarda 37ºC'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşünceye kadar, yaklaşık 24-72 saat, bekletildiler. İnkübasyon süresi sonunda enterokok üreyen (mavi-yeşil renge dönüşen) besiyerlerinden bir öze dolusu alınarak selektif katı besiyeri olan Enterokokosel Agar'a buyyonlardan bir öze dolusu olacak şekilde ekimler yapıldı. Besiyeri 37ºC'de aerobik koşullarda 24-48 saat süreyle inkube edildi. Sürenin sonunda görülen siyah-koyu kahverenginde koloniler enterokok türleri yönünden şüpheli kabul edilerek, daha detaylı incelenmek üzere tekrar enterokokosel agara ve kanlı ağara pasajlandı.

3. 2. 3. Enterokok İdentifikasyonu

Selektif besiyerinde siyah-koyu kahve renginde üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6,5 tuz içeren NB'da üreme ve lam üzerinde katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6,5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan koloniler enterokok şüpheli olarak kabul edilip; daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere moleküler testler yapılıncaya kadar -20º'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandılar.

3. 2. 3. 1. Katalaz Testi

Katalaz testi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz (hidrojen peroksit oksido redüktaz) enziminin varlığını saptamak amacıyla kullanılan bir testtir. Enzim hidrojen peroksidi (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrıştırır. Test, %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu damlatılmış bir lam üzerine, kanlı agara pasajlanmış mikroorganizma kültüründen bir öze dolusu alınıp, hidrojen peroksit solüsyonu ile karıştırılması ile gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda hava kabarcığı oluşan suşlar katalaz pozitif olarak, hava kabarcığı oluşturmayan suşlar (enterokoklar) katalaz negatif olarak değerlendirildi (Temiz 2000).

3. 2. 3. 2. %6,5 NaCl'de Büyüme

Enterokoklar için ayırt edici testlerden biridir ve identifikasyonda önemlidir. %6,5 oranında NaCl içeren NB ortamına ve aynı şekilde NaCl içermeyen NB ortamına da inokule edilen mikroorganizmaların, 24 saatlik inkübasyondan sonra büyümeleri kontrol edildi. Nutrient broth'daki kadar bulanıklık gözlenen NaCl'lü NB içeren tüplerdeki suşlar için sonuç pozitif olarak kaydedildi ve bu türlerle identifikasyona devam edildi (Gerhardt ve ark. 1994). Kontrol mikroorganizma olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı.

3. 2. 3. 3. *E. faecium* suşlarının identifikasyonu

Enterokok türlerinin biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyonları oldukça zor ve zaman alıcıdır. Bu nedenle çalışmada, izole edilen enterekok şüpheli izolatlar içerisindeki *E. faecium* suşlarını belirlemek için spesifik primer çifti kullanılarak PZR yapıldı. PZR için öncelikle izolatlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3. 2. 3. 3. 1. DNA İzolasyonu

İzole edilen suşlardan total DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

200 µl bakteri süspansiyonu 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırıldı.

65ºC'de 5 dakika inkube edildi.

600 µl kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

Presipitasyon solüsyonu, 720 µl steril distile su ile 80 µl 10x konsantre solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı.

Santrifüjden sonra üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi.

10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilerek vortekslendi.

300 µl soğuk etanol ilave edilerek 10 dakika -20 ºC'de DNA'nın presipitasyonu sağlandı.

10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

Üstteki etanol dökülerek pelet %70'lik soğuk etanol ile yıkandı.

DNA 100 µl steril distile suda çözdürülerek iyice karıştırıldı.

Her bir PCR reaksiyonu için 2 µl template DNA kullanıldı.

3. 2. 3. 3. 2. DNA'nın Elektroforezi

Agaroz jel elektoroforezi, %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirildi. 5 µl DNA, 1 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50 V'ta 60 dakika yürütüldü. Elektroforez sonucunda, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve ark. 1989).

3. 2. 3. 3. 3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı (Sambrook ve ark. 1989). Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları hesaplandı (OD260 ve OD280) ve bu değerler arasındaki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edildi. OD260/OD280 oranının 1,8-2,0 arasında olması DNA'nın saf

olduğunu, bu aralıktan daha aşağıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha yukarıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA miktarlarının hesaplanması için OD260 değeri kullanıldı ve DNA miktarları; DNA(µg/ml) = OD260 × Seyreltme Oranı × 50 formülü ile hesaplandı (Turner ve ark. 2004).

3. 2. 4. PZR

Tüm PZR reaksiyonlarında master miskler aşağıdaki gibi hazırlandı.

Master Mikslerin Hazırlanışı:

Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Tablo 2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Konsantrasyon)	**İstenen Son Konsantrasyon**	**10 örnek (µl)**
Buffer (10X)	1 X	30
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	24
dNTP (10 mM)	0.2 mM	6
Primer-F (100 pmol)	0.4 pmol	1.2
Primer-R (100 pmol)	0.4 pmol	1.2
Taq Polimeraz (5 U)	0.3 µl/ 50 µl	1.8
dH_2O	Son miktara tamamlanır	235.8

Master miksler hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanılan master miksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı.

3. 2. 4. 1. *Enterococcus* sp. ve *E. faecium* PZR

PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile *Enterococcus* sp. ve *E. faecium* için Tablo 3.'de gösterilmiştir.

Tablo 3. *Enterococcus* spp. ve *E. faecium* PZR koşulları

				***Enterococcus* spp.**	***E. faecium***
Basamak	**Döngü Sayısı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**
Başlangıç Denatürasyon	1	95	5 dk	95	5 dk
Denatürasyon	35	95	30 sn	95	30 sn
Bağlanma		55	30 sn	53	30 sn
Uzama		72	30 sn	72	30 sn
Son Uzama	1	72	15 dk	72	15 dk

3. 2. 4. 2. Genotipik Bakteriyosin Tespiti: Enterosin Yapısal Genlerinin (*ent*A, *ent*B, *ent*P) PZR ile Saptanması

Enterokok suşları tarafından en sık üretilen bakteriyosinler olan enterosin A, enterosin B ve enterosin P'nin yapısal genleri olan *ent*A, *ent*B, *ent*P varlığı PZR ile incelendi. Kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Tablo 4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Enterosin yapısal genlerinin PZR ile koşulları

		***ent*A**		***ent*B**		***ent*P**	
Basamak	**Döngü Sayısı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**
Başlangıç Denatürasyon	1	95	5 dk	95	5 dk	95	5 dk
Denatürasyon	35	95	30 sn	95	30 sn	95	30 sn
Bağlanma		55	30 sn	54	30 sn	52	30 sn
Uzama		72	30 sn	72	30 sn	72	30 sn
Son Uzama	1	72	15 dk	72	15 dk	72	15 dk

Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi: 6x loading dye boyasından pipet yardımıyla alınıp her bir örnek için 1 µl kadar dağıtıldı, daha sonra elde edilen 5 µl PZR ürünleriyle loading dye karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

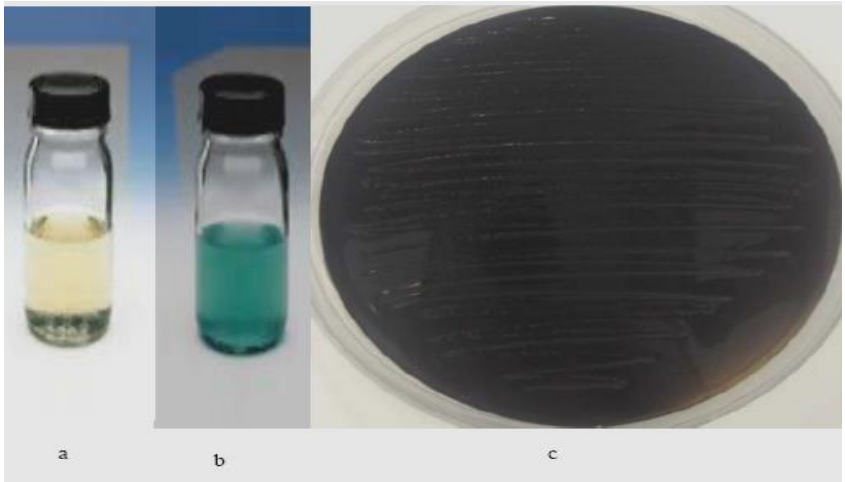
Yürütme: Hazırlanan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V 400A akımda 30 dakika yürütüldü.

Görüntüleme ve Değerlendirme: Yüz voltda otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde etidyum bromür olan tanka konuldu. Burada 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. Değerlendirme, jel UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PZR için ayrı olarak daha önce bildirildiği şekilde (Tablo 1.) değerlendirildi.

4. BULGULAR

4. 1. İzolasyon

Bu çalışmada 620 mastitisli süt örneği incelendi. Chromocult® Enterococci Agar'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) benzer görünümü (Resim 4.) olan bakteri kolonileri seçilerek toplamda 96 *Enterococcus* sp. şüpheli izolat elde edildi.



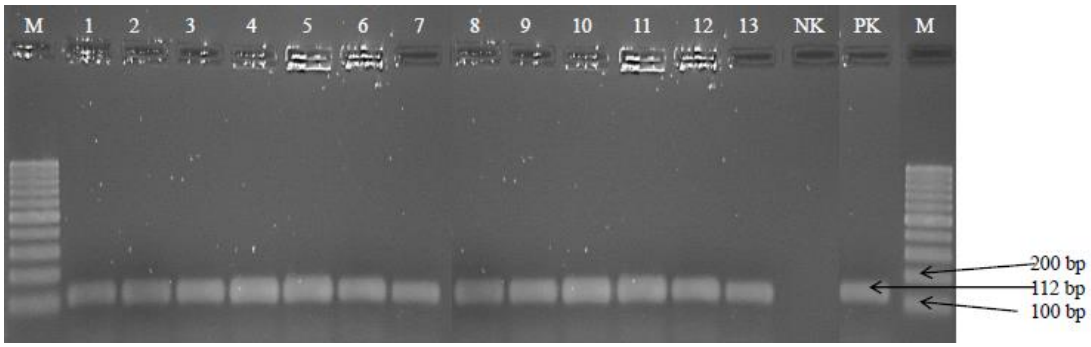
Resim 4. İzolatların selektif katı ve sıvı besiyerlerinde görünümü
a. Ekim yapılmamış EB **b.** EB'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşu **c.** EA'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşu

Bu izolatların Gram pozitif kok görünümünde olup %6,5 tuzlu NB'da üreyip, katalaz negatif oldukları doğrulandıktan sonra incelemeye dâhil edildiler.

4. 2. PZR

4. 2. 1. *Enterococcus* sp.

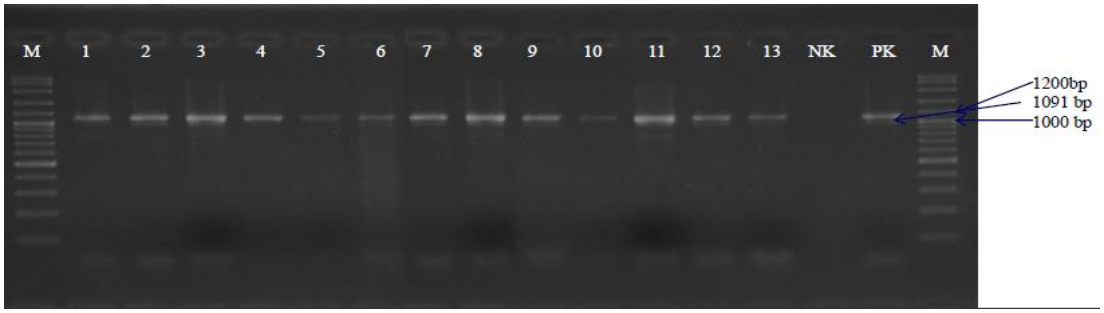
Doksan altı enterokok şüpheli suşun DNA'sı kullanılarak gerçekletirilen PZR sonrasında 112 bp uzunluğunda amplikon elde edilen 96 izolatın hepsinin *Enterococcus* sp. olduğu doğrulandı (Resim 5.).



Resim 5. *Enterococcus* sp. PZR elektroforez görüntüsü **1-13:** *Enterococcus* sp. saha izolatları **PK**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder

4. 2. 2. *E. Faecium*

Doksan altı *Enterococcus* sp. DNA'sı kullanılarak gerçekletirilen PZR sonrasında 1091 bp uzunluğunda amplikon elde edilen 13 izolatın (%13,5) *E. faecium* olduğu belirlendi (Resim 6.).



Resim 6. *E. faecium* PZR elektroforez görüntüsü **1-13:** *E. faecium* saha izolatları **PK**: Pozitif kontrol (Sekanslanmış saha suşu) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder

E. faecium saha izolatlarından bir tanesi sekanslandı ve sekans sonucu *E. faecium* olduğu belirlenen bir izolat pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı (Resim 7.).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJUP01000007.1	Enterococcus faecium LCT-EF128 Scaffold1_7, whole genome shotgu	534	1004	94%	2e-147	96%
NZ_ABSC01000055.1	Enterococcus faecium E1679 Contig00055, whole genome shotgun se	534	1004	94%	2e-147	96%
NZ_ABRY01000057.1	Enterococcus faecium E1636 Contig00058, whole genome shotgun se	534	1004	94%	2e-147	96%
NZ_ABQI01000017.1	Enterococcus faecium E1071 Contig00017, whole genome shotgun se	534	1004	94%	2e-147	96%
NZ_ACZZ01000070.1	Enterococcus faecium D344SRF cont1.70, whole genome shotgun se	534	1004	94%	2e-147	96%
ACOB01000040.1	Enterococcus faecium TC 6 cont1.40, whole genome shotgun sequer	534	1004	94%	2e-147	96%
NZ_ACOS01000109.1	Enterococcus faecium E1039 contig00118, whole genome shotgun se	523	966	94%	4e-144	94%
NZ_ACAY01000070.1	Enterococcus faecium 1,231,501 cont1.70, whole genome shotgun s	523	966	94%	4e-144	94%

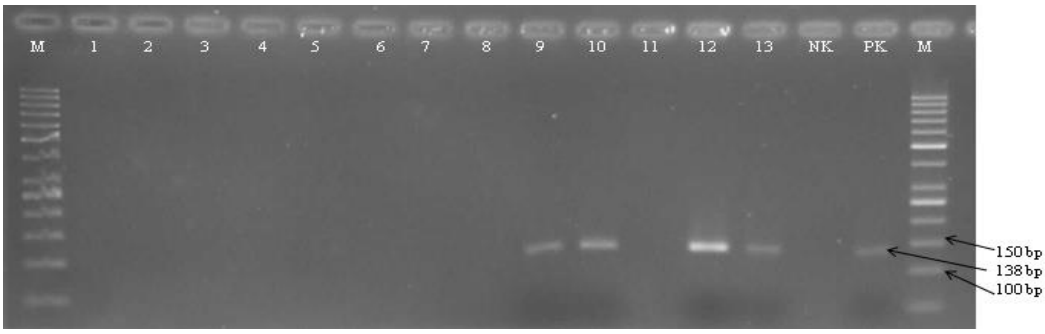
Resim 7. *E. faecium* sekans sonucu

4. 2. 3. Genotipik Bakteriyosin Tespiti

İzole edilen 13 *E. faecium* suşunda en sık görülen üç bakteriyosin yapısal gen (*ent*A, *ent*B, *ent*P) varlığı PZR ile incelendi. Bakteriyosin yapısal gen tespiti için gerçekleştirilen PZR'da pozitif kontrol olarak geçmiş yıllarda izole edilmiş *ent*A, *ent*B, *ent*P genleri pozitif olduğu belinen *E. faecalis* saha suşlarının DNA'ları kullanıldı.

4. 2. 3. 1. *ent*A

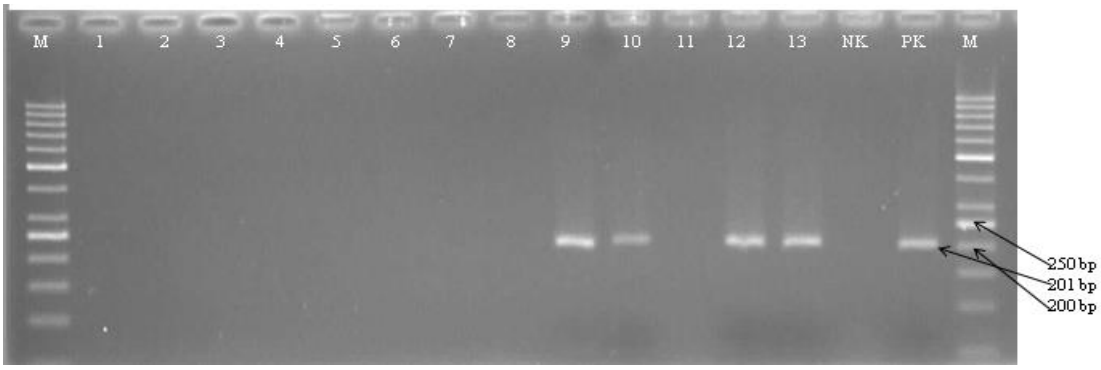
İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekletirilen PZR sonrasında 138 bp uzunluğunda amplikon elde edilen 4 izolatın (%30,8) *ent*A geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 8.).



Resim 8. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*A) **9.,10.,12.,13.** *Ent*A geni taşıyan saha izolatları **PK**: Pozitif kontrol (*Ent*A geni pozitif saha izolatı) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 50 bp DNA ladder

4. 2. 3. 2. *ent*B

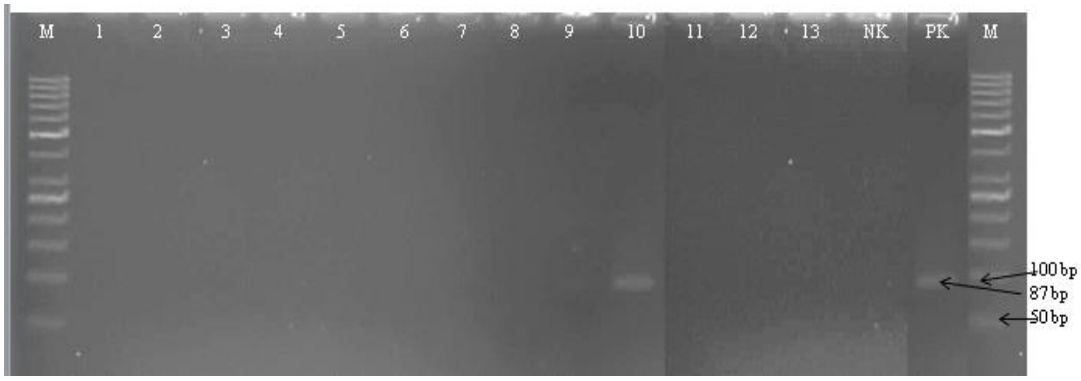
İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekletirilen PZR sonrasında 201 bp uzunluğunda amplikon elde edilen 4 izolatın (%30,8) *ent*B geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 9.).



Resim 9. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*B) **9.,10.,12.,13.** *Ent*B geni taşıyan saha izolatları **PK**: Pozitif kontrol (*Ent*B geni pozitif saha izolatı) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 50 bp DNA ladder

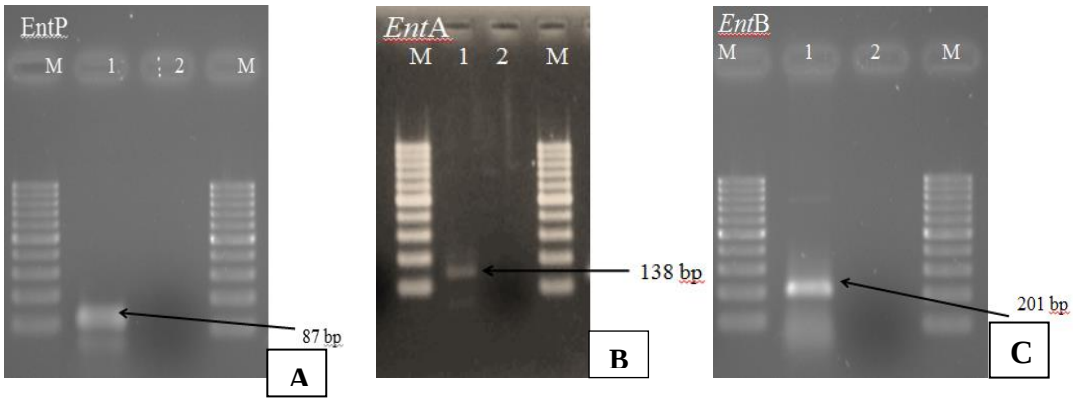
4. 2. 3. 3. *ent*P

İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekletirilen PZR sonrasında 87 bp uzunluğunda amplikon elde edilen 1 izolatın (%7,7) *ent*P geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 10.).



Resim 10. Bakteriyosin yapısal gen PZR (*Ent*P) **10.** *Ent*P geni taşıyan saha izolatı **PK**: Pozitif kontrol (*Ent*P geni pozitif saha izolatı) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 50 bp DNA ladder

E. faecium izolatların bakteriyosin yapısal genlerinin (*Ent*P, *Ent*A, *Ent*B) toplu olarak agaroz jel elektroforez görünümleri Resim 11.'de gösterilmiştir.



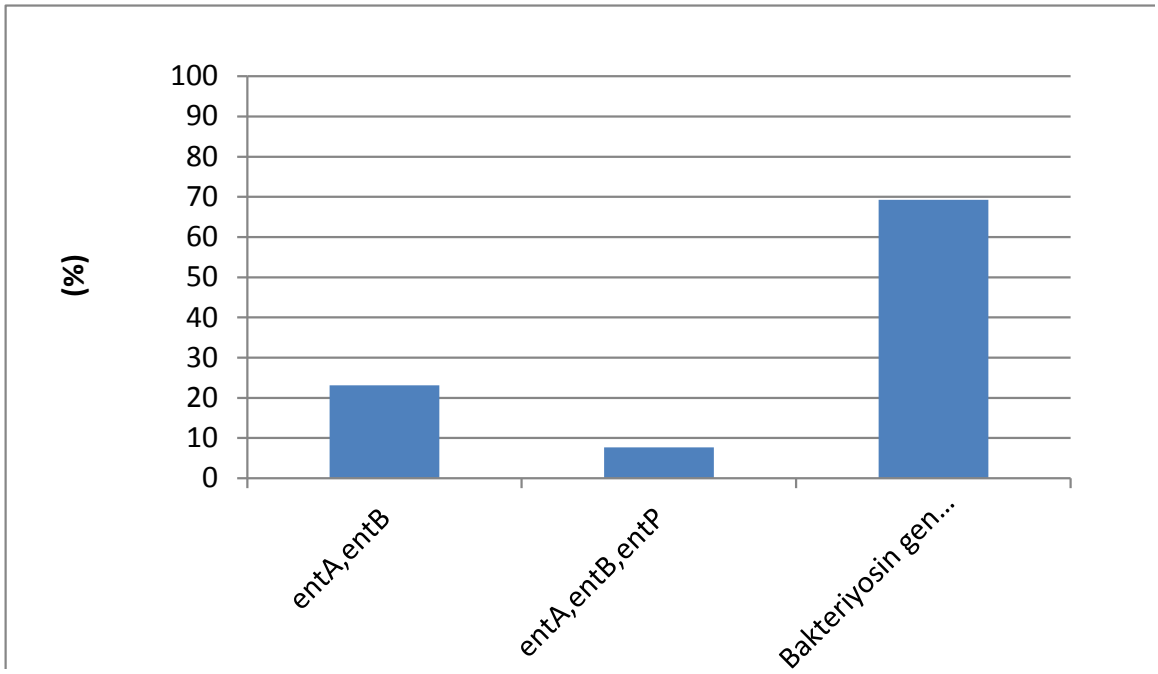
Resim 11. *E. faecium* izolatların bakteriyosin yapısal genlerinin (A: Ent*P*, Ent*A*, Ent*B*) agaroz jel elektroforez görünümleri. **M:** Marker (100 bp DNA Ladder) **1:** Herhangi bir bakteriyosin geni taşiyan pozitif saha izolatları **2.** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922). **A:** *Ent*P (87 bp) **B:** *Ent*A (138 bp), **D:** *Ent*B (201 bp)

Tespit edilen farklı bakteriyosin yapısal gen sayıları ve gen kombinasyonları Tablo 5. ile Resim 12.'de gösterilmiştir. Bakteriyosin yapısal genlerinden *ent*A ve *ent*B genleri izolatların %30,8 (4 suş)'inde belirlenirken; *ent*P genini %7,7(1 suş) oranında bulunuyordu. Sonuçlar bakteriyosin yapısal gen kombinasyonları yönünden

değerlendirildiğinde ise iki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23,0 (3 suş) oranında *ent*A+*ent*B gen kombinasyou ikincisi ise %7,7 (1 suş) oranında *ent*A+*ent*B+*ent*P genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondu.

Tablo 5. *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin genleri

	***ent*P**	***ent*A**	***ent*B**	**Bakteriyosin gen kombinasyonları (sayısı)**
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4	-	-	-	
5	-	-	-	
6	-	-	-	
7	-	-	-	
8	-	-	-	
9	-	+	+	*ent*A, *ent*B
10	+	+	+	*ent*P, *ent*A, *ent*B
11	-	-	-	
12	-	+	+	*ent*A, *ent*B
13	-	+	+	*ent*A, *ent*B
Toplam (%)	**1 7,7**	**4 30,8**	**4 30,8**	



Resim 12. *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin gen kombinasyonları

5. TARTIŞMA

Enterokok cinsi bakteriler üzerine olan ilgi son yıllarda, bu bakterilerin önemli nazokomial patojenler olarak kabul edilmeleri ile birlikte, transfer edilebilir veya kazanılabilir çoklu antibiyotik dirençliliklerinin bulunması nedeni ile de artmıştır (Eaton ve Gasson 2001). Enterokok cinsi bakteriler insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaşayan saprofit bakterilerdirler bu karmaşık ekosistemde hayatta kalmak için ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek zorundadırlar (Lorenzelli 1994, Turtura ve Giraffa 1995).

Enterokok cinsi mikroorganizmaların çok farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Kommensal bağırsak florasının en önemli üyelerinden olan bu mikroorganizmalar, insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılabildiği gibi, çeşitli fermente gıdaların üretim veya korunmasında starter ya da koruyucu kültür olarak (gıda biokoruyucusu) kullanılabilecekleri bilinmektedir. Aynı zamanda, enterokokların, bakteriyosin ya da daha spesifik bir ifade ile enterosinler olarak bilinen antimikrobiyal peptitler ürettikleri de bildirilmektedir (Turtura ve Giraffa 1995). Üretilen bu enterosinler kendilerini üreten suşlarla yakın ilişkili suşlara karşı inhibitör (önleyici) aktivite gösterirler (Cintas ve 2001).

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ekosistemde yaşayan bakteriyosin üretmeyen diğer bakteriler üzerine ekolojik üstünlüğü bulunmaktadır. Farklı orjinlerden izole edilen enterokok suşlarının ürettiği farklı enterosinlerin incelendiği yayınlar bulunmaktadır (De Vuyst ve ark. 2003, Hugas ve ark. 2003). Bakteriyosin üreten enterokokların önemli bir kısmı gıdalardan (peynir, et, balık, sebze) insanlar ve hayvanlardan (Brandão ve ark. 2010, Foulquie ve ark. 2006) izole edilmektedir. Bakteriyosin üreten enterokoklar aynı zamanda çöplerden (Laukova ve Jurin 1997), atık sulardan (Marekova ve ark. 2007), farklı ruminantların rumen içerikleri ve hayvansal atıklardan (Laukova ve Marekova 2001) izole edilmiştir. Bununla birlikte hayvansal kaynaklardan izole edilmiş olan enterokok izolatlarının incelendiği çalışmalar sınırlı olmakla birlikte (Du Toit ve ark. 2000, Del Campo ve ark. 2001, De Vuyst ve ark. 2003), mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği çok az çalışma bulunmaktadır (Kim ve ark. 2008). Kim ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları

bu çalışmada enterokokların yalnızca fenotipik olarak bakteriyosin oluşturabilme kapasiteleri incelenmiş, gen düzeyinde bir inceleme yapılmamıştır. Bununla birlikte yurdumuzda mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecium* suşlarının bakteriyosin üretme kapasitelerinin incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışmada da mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan 11 *E. faecium* suşlarının en önemli bakteriyosin genleri olan enterosin A, enterosin B ve enterosin P'yi taşıma potansiyellerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sınıf II bakteriyosinler 3 grupta incelenir. Birinci grupta pediosin ailesinin enterosinleri olan enterosin A ve enterosin P bulunur. İkinci grupta, lider peptid olmaksızın sentezlenen bakteriyosinlerden olan enterosin L50A/B, üçüncü grupta ise yine biyokimyasal yapıları daha farklı lineer pediosin olmayan enterosinlerden olan enterosin B yer almaktadır. (Nilsen ve ark. 2003). Farklı orjinlerden izole edilmiş olan E. *faecium* suşlarında tekli ve çoklu enterosin yapısal genlerinin varlığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Poeta ve ark. 2006, Poeta ve ark. 2007, Özdemir ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar genellikle dışkı, çevresel örnekler ve gıdalardan izole edilen enterokok suşları üzerine odaklanmıştır.

Yapılan bir çalışmada kümes hayvanlarının dışkı örneklerinden 76 enterokok (43 *E. faecalis*, 30 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 1 *E. hirae*) izole edilmiş ve bu enterokoklarda bakteriyosin gen varlığı PCR ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda *ent*A ve *ent*B genleri 9 *E. faecium* izolatında belirlenmiştir (Poeta ve ark. 2006).

Yine Poeta ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada enterosin A yapısal geni olan *ent*A 15 *E. faecium* suşunda tespit edilmekle birlikte bunlardan 12 tanesinde *ent*B geninin de bulunduğu bildirilmiştir. *ent*A, *ent*B, ve *ent*P gen kombinasyonu yırtıcı bir kuş ve bir tilkiden izole edilmiş olan 2 *E. faecium* izolatında saptanmıştır (Poeta ve ark. 2007).

Özdemir ve arkadaşları (2011) çevresel örneklerden 57 enterokok (34 *E. faecium*, 6 *E. hirae*, 4 *E. casseliflavus*, 4 *E. durans*, 4 E. faecalis, 3 E. mundtii ve 2 *E. avium*) izole etmişler ve 34 *E. faecium* izolatlarının 22'sinin *ent*A, *ent*B, *ent*P; 9'unun *ent*A, *ent*B, bir tanesinin *ent*A ve *ent*P yapısal genlerini taşıdığını bildirirlerken 2 izolatın herhangi bir yapısal gen taşımadığı

belirlenmişlerdir.

Bazı çalışmalarda fermente gıdalardan izole edile edilmiş enterokoklarda birden fazla bakteriyosin kodlayan genin PCR ile saptanmasının çok sık görülmediği bildirilmekle birlikte (Ben Belgacem ve ark. 2010, Edalatian ve ark. 2012, Özden Tuncer ve ark. 2013), Özden Tuncer ve ark. (2013) peynirden izole ettikleri 3 *E. faecium* suşunun birinin *ent*A ve *ent*B, ikisinin ise *ent*A, *ent*B ve *ent*P taşıdığını bildirmişler. Bu çalışmada da, yukarıda bildirilen çalışmalara benzer bir şekilde *ent*A ve *ent*B genleri izolatların %30,8 (4 suşda) belirlenirken; *ent*P genini izolatların %7,7'si (1 suş) taşımaktaydı.

Yapılan çalışmalarda enterosin B yapısal geninin genellikle enterosin A yapısal geni ile birlikte bulunduğu bildirilmektedir (Casaus ve ark. 1997, Brandão ve ark. 2010, Özdemir ve ark. 2011). Yaptığımız bu çalışmada da, diğer çalışmalara benzer bir şekilde, enterosin B yapısal genlerinin hepsi enterosin A yapısal geni ile birlikte bulunmaktadır. Bu durumun genellikle enterosin B üretimi için transport gen bulunmamasına bağlı olduğu bildirilmektedir (Franz ve ark. 1999, De Vuyst ve ark. 2003). Bununla birlikte, geçmiş yıllarda yapılmış bir çalışmada ise bir *E. faecium* izolatının *ent*A ve *ent*P yapısal genlerini birlikte bulundurduğu bir çalışma da bulunmaktadır (Özdemir ve ark. 2011).

Çeşitli çalışmalarda, çeşitli bakteriyosinleri üreten enterokokal suşların yüksek genetik potansiyellerinin olduğu bildirilmektedir (Casaus ve ark. 1997, Cintas ve ark. 2000, Poeta ve ark. 2007). Enterosin yapısal genlerinin farklı kombinasyonlarının incelenmesi ile olarak, bizim çalışmamızda 3 farklı genin 2 farklı kombinasyonuna rastlandı. Bunlar %23,0 oranında (3 suşda) *ent*A+*ent*B ve %7,7 oranında (1 suşda) *ent*A+*ent*B+*ent*P genlerinin birlikte görüldüğü gen kombinasyonlarıydı. Yapılan pek çok çalışmada da benzer gen kombinasyonları bildirilmektedir (Poeta ve ark. 2006, Poeta ve ark. 2007, Özdemir ve ark. 2011). Çok görülen enterosin genlerinin dağılımı enetrokokların genetik materyali suşlar arasında vermesi ya da almasına bağlı olabilir (Strompfova ve ark. 2008).

Pekçok araştırmacı, enterokoklarda, gastrointestinal sistemde fazla miktarda canlı enterokokun var olması ve yaşaması kadar intestinal floradaki mikroorganizma dengesi ve

bakteriyel sinergizmin etkisi gibi, eksternal faktörler tarafından aktive edilebilen sessiz bakteriyosin genlerinin varlığını tanımlamıştır (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Poeta ve ark. 2007). Enterosin yapısal genlerinin saptanması her zaman enterosin üretimi anlamına gelmez (Strompfova ve ark. 2008) ve sessiz bakteriyosin genlerinin varlığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Poeta ve ark. 2008, Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003). Nes ve ark. (2007); bakteriyosin genlerinin belirlenmesinin ilgili bakterinin mutlaka antibakteriyel aktiviteye sahip olması gerekmediğini ve saptanabilir antibakteriyel aktivitenin olmamasının da bakteriyosin üretimi olmadığı anlamına gelmediğini bildirilmiştir. Bunun nedeni, ilk olarak, bazı peptid bakteriyosinler hedef bakteri üzerine dar spektrumda etkili olabilir, bu da duyarlı bir indikatör kullanımı için anahtar bir öneme sahiptir. İkincisi, peptid bakteriyosin üretiminin sıklıkla düzenlenmesidir. Antibakteriyel aktivite üretiminin yetersizliği genellikle fonksiyonel olmayan bir genetik sistemle ilişkilidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Aydın yöresinde, sığır mastitislerine sebep olan etkenler içerisinde *E. faecium*'un önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir.

Biyokimyasal testler kullanılarak enterokokların identifikasyonlarının yapılması zor, zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, mastitis etiyolojisinde önem kazanan enterokokların daha ileri tekniklerle güvenilir bir şekilde identifikasyonlarının yapılabilmesi, süt sığırcılığı ekonomisine de katkı sağlayacaktır. Enterokokların cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımının fazla sayıda izolatın, kısa sürede identifikasyonlarının yapılabilmesine imkan vermesi sebebi ile faydalı olduğu ve rutin teşhiste kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının bakteriyosin yapısal genlerinden *ent*A ve *ent*Bgenleri tespit edilen 4 suş (%30,8) belirlenirken; *ent*P genini 1 (%7,7) suşun taşıdığı belirlendi. Bu şekilde birden çok enterosin genini içeren dört *E. faecium* izolatının çeşitli enterosinleri üretebilen genetik potansiyelleri yüksek izolatlar oldukları düşünülebilir. Enterokoklarda bakterisyosin yapısal genlerinin farklı kombinasyonlarının yaygın görülmesi onların biyoteknolojik uygulamalarda, gıda veya ilaç endüstrisinde ya da insan ya da hayvan sağlığında probiyotik olarak kullanımları için uygun olabilir. Bununla birlikte, enterokok suşlarının halk sağlığı üzerine güvenlik ve etkileri, onların endüstriyel potansiyellerinden tam olarak faydalanabilmek için dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Gelecekte mastitisli sığır sütlerinden izole edilen diğer enterokoklarda bu genlerinin dağılımının bilinmesi ve bu bakteriyosinlerin endüstriyel potansiyellerinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim 1. Bakteriyosin üreten suşlar ve saflaştırılmış bakteriyosinler yiyeyeceklerde hayvanlarda ve ilaçlarda kullanılabilir**.**

Erişim Adresi: http://dx.doi.org, Erişim Tarihi**:** 26 Mayıs 2014.

Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. Third Edition, USA, 2004.

Baştan A. İneklerde Meme Hastalıkları, Hatipoğlu Basım ve Yayım San. Tic. Ltd. Şti. Ankara, 2002.

Ben Belgacem Z, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martínez-Canamero M, Gálvez A, Manai M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunusian fermented meat. *Food Control* 2010, 21, 462-470.

Bernbom N, Licht TR, Brogren CH, Jelle B, Johansen AH, Badiola I. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Applied Environmental Microbiology* 2006, 72, 239–244.

Brandão A, Almeida T, Muñoz-Atienza · E, Torres C, Igrejas G, Hernández PE, Cintas LM, Poeta P, · Herranz C. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Archives Microbiology* 2010, 192, 927–936.

Casaus P, Nilsen T, Cintas L M, Nes, IF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin. *Microbiology* 1997, 143(7), 2287-2294.

Chumchalová J, Šmarda J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica* 2003, 48(1), 111-115.

Cintas L M, Casaus P, Håvarstein LS, Hernandez P E, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63(11), 4321-4330.

Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Håvarstein LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from Enterococcus faecium L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology* 1998, 180(8), 1988-1994.

Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Holo H, Hernández PE, Nes IF, Håvarstein LS. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology* 2000, 182: 6806–6814.

Cintas LM, Casaus MP, Herranz, C, Nes IF, Herna´ndez PE Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences Technol*ogy 2001, 7, 281–305.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins, safe, natural, antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 71: 1-20.

Clewell D B, Gawron-Burke C. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annual Reviews in Microbiology* 1986, 40(1), 635-659.

Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins aviable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* 2013, 11(2), 95-105.

De Vuyst L, Vandamme E. Nisin, a Lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteri, Microbiology and Genetics Applications* 1994, 151-221.

De Vuyst L, Foulquie Moreno MR, Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84: 2003, 299–318.

Del Campo R, Tenorio C, Jimenez-Diaz R, Rubio C, Gomez-Lus R, Baquero F, Torres C. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2001, 45, 905–912.

Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied Environmental Microbiology* 2012, 78, 1–6.

Du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88, 482–494.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology* 2001, 67, 1628–1635.

Edalatian **MR, Najafi MBH, Mortazavi SA.** Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eurpean Food and Research Technology* 2012, 234, 789–796.

Economou A. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Molecular Microbiology* 1998 27(3), 511-518.

Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, DeVuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 2006, 106, 1–24.

Franz CM, Worobo RW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzapfel WH, Vederas JC, Stiles ME. A typical genetic locus ciated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied Environmental Microbiology* 1999, 65, 2170–2178.

Franz C M, Van Belkum M, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme 2007, *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 293-310.

Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 2002, 84(5), 577-592.

Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington DC, 1994.

Ghrairi T, Chaftar N, Hani K. Bacteriocins: recent advances and opportunities. *Progress in Food Preservation* 2012, 485-511.

Gillor O, Nigro LM, Riley M A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design* 2005, 11(8), 1067-1075.

Gouaux E. The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure* 1997, 5(3), 313-317.

Gutiérrez J, Larsen R, Cintas LM, Kok J, Hernández P E. High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 72(1), 41-51.

Hammami R, Zouhir A, Hamida J B, Fliss I. Bactibase: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology* 2007, 7(1), 89.

Heikens E, Bonten M J, Willems R J. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology* 2007, 189(22), 8233-8240.

Health Protection Agency. Identification of *Streptococcu*s species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. 2007, National Standard Method BSOP ID 4Issue 2.

Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 88, 223–233.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* 1998, 4(2), 239.

Huycke MM, Abrams V, Moore DR. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002, 23(3), 529-536.

Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 2003, 82(4), 640-647.

Kang JH, Lee MS. Characterization of a bacteriocin produced by Enterococcus faecium GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98(5), 1169-1176.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37, 3497–3503.

Kim SY, Park YK, Kim SH, Shin S, Koo HC, Youn JH, So JH, Paik HD, Park YH, Choi KY. Isolation of bacteriocin producing bacteria from bovine milk effective to bovine mastitis-causing and other antibiotic-resistant bacteria. *The Congress of FAVA, FAVA - OIE Joint Symposium on Emerging Diseases.* 2008, 27-30 October, Bangkok, Thailand.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3497–3503.

Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (1999), *FEMS Microbiology Reviews* 1993, 12(1-3), 39-85.

Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina MV. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2007, 38, 15–18.

Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Canadian Journal of Microbiology* 2010, 56, 715–29.

Laukova´A, Jurin P. Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. Microbios 1997, 97, 73–80.

Laukova A, Marekova M. Production of bacteriocins by different Enterococcal isolates. *Folia Microbiologica* 2001, 46, 49–52.

Lorenzelli P. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiological Research* 1994, 149, 203–213.

Marekova M, Laukova A, Skaugen M, Nes I. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2007,34: 533–7.

Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996,70(2-4), 113-128

Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology* 2007, 189, 1189–98.

Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a cell Wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied Environmental Microbiology* 2003, 69, 2975–84

Oscáriz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology* 2001, 4(1), 13-19.

Özdemir BG, Oryaşın E, Bıyık HH, Özteber M, Bozdoğan B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian Journal of Microbiology* 2011, 51, 182–7.

Özden Tuncer B, Ay Z, Tuncer Y. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turkish Journal of Biology*, 2013, 37, 443-449.

Parada J, Aguilera JM. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science* 2007, 72(2), R21-R32.

Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Diseases* 2006, 50, 64-68.

Poeta P, Costa D, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiological Research* 2007, 162, 257-263.

Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodrigues J, Torres C. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *Journal of Basic Microbiology* 2008, 48(5), 385-392.

Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review Microbiology* 2002, 56, 117-137.

Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA. Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1984, 34(1), 31-34.

Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JJF, Tenreiro R, Crespo MTB. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41, 2569–2576.

Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 121(2), 123-138.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2013, 63(1), 11-30.

Strompfová V, Lauková A, Simonová M, Marcináková M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Veterinary Microbiology* 2008, 10, 132(3-4), 293-301.

Temiz A. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara 2000; 291.

Turner PC, Mclennan AG, Bates AD, White MRH. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Nobel Yayın 2004, 613:346.

Turtura GC, Giraffa G. Enterococcal bacteriocins: their potencial as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology* 1995, 12, 291–299.

van Heel A J, Montalban-Lopez M, Kuipers O P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology* 2011, 675–680.

Vilela MA, de Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, de Morais Jr MA, da Costa Darini AL, de Morais MMC. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Memorias Do Instito Oswaldo Cruz* 2006, 101(7), 716-719.

Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* 2014, 5, 241.

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

25/01/2016

İmza

Yeter DELİBAŞ

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: DELİBAŞ, Yeter
Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti/Birleşik Krallık
Telefon: 507 604 25 08
E-mail: yeterdl@hotmail.com
Diller: İngilizce, Türkçe

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	-	-
Yüksek Lisans	University of Kent Department of Bioscience (Post Graduate Diploma in Bioscience), Thesis Titile: *Investigation of two Drosophila Innexins, Inx2 and Ogre, in the Developing Nervous System*	2007
Lisans	Cumhuriyet Universitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	1989

İŞ DENEYİMİ

Ünvan	Yer/Kurum	Yıl
Öğretmen	Sırımlı Köyü İlkokulu	1992
Öğretmen	Kalfaköy İlkokulu	1993
Manager	University of Kent	1994
Öğretmen	Özel Yüzyıl Bezci Koleji	2008
Öğretmen	Kuruköy İlk Öğretim Okulu	2009
Öğretmen	Karpuzlu Anadolu Lisesi	2012
Öğretmen	Germencik Anadolu Lisesi	2013