



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**AKSARAY'DA ÜRETİLEN TULUM PEYNİRLERİNDE
ENTEROCOCCUS CİNSİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şule AYHAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

AKSARAY, 2021

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182324004 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, Şule AYHAN tarafından hazırlanan “**AKSARAY’DA ÜRETİLEN TULUM PEYNİRLERİNDE *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Oy Birliği ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

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

Üye: Prof. Dr. Ahmet GÜNER

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

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

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayhan DURAN

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

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

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2021

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

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali Hınıs

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Şule AYHAN

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı veren, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyerek, ilgiyle, anlayışla ve sabırla yanımda olan ve üzerimdeki desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte çalışmamın daha iyiye gitmesi yönünde yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tez yazım aşamasında karşılaştığım sorunlarda bilgisine ve görüşlerine başvurduğum, deneysel aşamalarda da yardımını aldığım Arş. Gör. Furkan AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim, analiz çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan, çalışmalarımın planlanmasında ve karşılaştığım problemleri çözmem de tavsiyeler sunan ve tezim dışında her konuda desteğini aldığım Arş. Gör. H. İbrahim KAHVE'ye teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını aldığım Mustafa Enes ARSLAN, Damla UMAR ve Merve CAN'a teşekkür ederim.

Şule AYHAN
AKSARAY, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Peynir	3
2.2 Tulum Peyniri	4
2.2.1 Tulum peynirlerinin özellikleri.....	6
2.2.1.1 Kimyasal özellikleri	6
2.2.1.2 Mikrobiyolojik özellikleri.....	8
2.3 Enterokoklar.....	10
2.4 Mikroorganizmalarda Antibiyotik Dirençlilik	13
2.4.1 Antibiyotik direnç gelişimi	16
2.4.2 Antibiyotik direnç aktarımı.....	17
2.5 Enterokoklarda Tanımlama Yöntemleri.....	19
2.5.1 Moleküler yöntemeye dayalı tanımlama	19
2.5.1.1 PZR yöntemine dayalı tanımlama.....	19
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1 Materyal.....	21
3.2 Metot.....	21
3.2.1 Enterokok suşlarının izolasyonu ve saflaştırılması.....	21
3.2.1.1 Enterokok suşlarının izolasyonu	21
3.2.1.2 İzolatların saflaştırılması.....	21
3.2.2 Enterokokların ön identifikasyonu	22
3.2.2.1 Katalaz testi.....	22
3.2.2.2 Gram boyama	22
3.2.3 Saf kültürlerin muhafazası	23
3.2.4 <i>Enterococcus</i> suşlarının PZR yöntemi ile tanımlanması	23
3.2.4.1 DNA izolasyonu.....	23
3.2.4.2 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu	24
3.2.4.3 PZR’da çoğaltılan DNA örneklerinin jel elektroforezinde	
kontrolü ve dizi analizi.....	25
3.2.4.4 Verilerin işlenmesi ve filogenetik analizler	26
3.2.5 <i>Enterococcus</i> suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin saptanması	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1 <i>Enterococcus</i> Suşlarının İzolasyon Sonuçları	29
4.2 <i>Enterococcus</i> Suşlarının PZR Yöntemi İle Çoğaltılan DNA Örneklerinin	
Agaroz Jelde Görüntüsü	29
4.2.1 16S rRNA gen bölgesinin dizi analiz sonuçları.....	30
4.2.2 Filogenetik analiz sonuçları	37
4.3 <i>Enterococcus</i> Türlerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ.....	53

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKSARAY’DA ÜRETİLEN TULUM PEYNİRLERİNDE *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Şule AYHAN

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, Aksaray ilinde satışa sunulan 22 adet tulum peyniri örneklerinde *Enterococcus* cinsi bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Gram-pozitif ve katalaz-negatif reaksiyonlar veren morfolojik testler neticesinde ön identifikasyonu yapılan suşlar *Enterococcus* spp. olarak değerlendirilmiştir. Saflık kontrolü sonrası 62 izolat -24 °C’de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu neticesinde izolatların 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılarak sekanslatılmıştır. Sekanslama sonucunda tür düzeyinde *E. faecium* (n = 30), *E. faecalis* (n = 25) ve *E. durans* (n = 7) olarak tanımlanmıştır. Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve 14 adet antibiyotiğe karşı duyarlılıkları test edilmiştir. İzolatların toplamda nalidiksik aside (%100), oksasiline (%92) ve streptomisine (%72.6) karşı orta veya yüksek derecede direnç gösterdiği saptanmıştır. *E. faecalis* suşlarının klinik olarak önem arz eden çeşitli antibiyotiklere *E. faecium* ve *E. durans* suşlarından daha dirençli fenotipleri olduğu görülmüştür. Çoklu antibiyotik direncinin %41.93 olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tulum peyniri, *Enterococcus*, PZR, antibiyotik direnç.

Ocak, 2021; 53 sayfa

M. Sc. THESIS

**ISOLATION OF *ENTEROCOCCUS* TYPE BACTERIA BY PZR METHOD IN
TULUM CHEESES PRODUCED IN AKSARAY IDENTIFICATION AND
DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE**

Şule AYHAN

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

ABSTRACT

Within the scope of this study, isolation and identification of *Enterococcus* genus bacteria from 22 Tulum cheese samples sold in Aksaray province were performed and their antibiotic susceptibilities were determined. Gram-positive and catalase-negative strain were evaluated to be *Enterococcus* spp as a result of morphological tests. After purification 62 *Enterococcus* isolate were stored at -24 °C. After DNA isolation, the 16S rRNA gene region of the isolates was amplified and sequenced. As a result of sequencing, the species were identified as follows: *E. faecium* (n = 30), *E. faecalis* (n = 25) and *E. durans* (n = 7). Antibiotic susceptibilities to 14 different antibiotics of the strains were performed using the disc diffusion method. It was determined that the isolates showed moderate or high resistance to nalidixic acid (100%), oxacillin (92%), and streptomycin (72.6%) in total *E. faecalis* strains were found to have more resistant phenotypes to various clinically important antibiotics than *E. faecium* and *E. durans* strains. Multiple antibiotic resistance was found to be 41.93%.

Keywords: Tulum cheese, *Enterococcus*, PZR, antibiotic resistance.

January, 2021; 53 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. KEA üzerinde gelişen muhtemel enterokok kolonileri ve saflaştırma basamakları.	22
Şekil 3.2. Saflaştırılmış izolatların gram reaksiyonlarının mikroskoptaki görüntüsü.	23
Şekil 3.3. P ₁ E ₁ numaralı izolatın spektrofotometrik DNA grafiği.	24
Şekil 4.1. <i>Enterococcus</i> spp. suşlarının genomik DNA örneklerinin (P ₁ E ₁ -P ₁₁ E ₃) jel elektroforez görüntüsü.	29
Şekil 4.2. <i>Enterococcus</i> spp. suşlarının genomik DNA örneklerinin (P ₁₂ E ₁ -P ₂₂ E ₃) jel elektroforez görüntüsü.	30
Şekil 4.3. Bu çalışma kapsamında elde edilen izolatlar ile NCBI veritabanından elde edilen referans izolatlar ile elde edilen filogenetik ağaç.	37
Şekil 4.4. <i>Enterococcus durans</i> P ₂₂ E ₃ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.	38
Şekil 4.5. <i>Enterococcus faecalis</i> P ₉ E ₁ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.	38
Şekil 4.6. <i>Enterococcus faecium</i> P ₁₈ E ₂ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tulum peynirlerinin kimyasal bileşimi, pH ve Asidite değerleri.	7
Çizelge 2.2. Tulum peynirleri üzerine yapılan mikrobiyolojik analiz bulguları.....	9
Çizelge 2.3. Enterokok grubuna ait bakteri türleri.	11
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı.	25
Çizelge 3.2. PZR amplifikasyonu için oluşturulan PZR şartları.....	25
Çizelge 3.3. <i>Enterococcus</i> türleri için antibiyotik duyarlılık sınırları.	27
Çizelge 4.1. Enterokok türlerinin izolat kodu ve NCBI erişim numaraları.	31
Çizelge 4.2. <i>Enterococcus</i> spp. suşlarının tür düzeyinde dağılımı.	33
Çizelge 4.3. Tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri.	40
Çizelge 4.4. Suşlar arasında tespit edilen çoklu antibiyotiğe direnç.....	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	Amplifikasyon
bp	Baz çifti
CASO Agar	Casein-peptone Soymeal-peptone Agar
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
ddH₂O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	DNA nükleotid bazları
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FP	İleri primer
g	Gram
GRAS	Generally Recognized as Safe
H₂O₂	Hidrojen peroksit
KEA Agar	Kanamisin Eskulin Azid Agar
Km	Kuru madde
Kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MALDI-TOF-M	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Neutral Density
ng	Nanogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RP	Geri primer
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
TAE	Tris-Asetat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TSB	Tryptic Soy Broth
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
VRE	Vankomisin Dirençli Enterokok
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Süt, değerli bir besin kaynağıdır. Sadece insanlar için değil, zengin besin içerikleri bakımından mikroorganizmaların gelişmeleri için de uygun bir ortamdır. Bu nedenle süt kolay bozulabilen, mikrobiyal faaliyet açısından riskli gıdalar grubunda yer almaktadır. İnsanlar, sütün ömrünü uzatmak, uzun süre depolanmasını ve taşınmasını kolaylaştırmak için rutubet oranını da azaltarak çeşitli teknolojik yollar vasıtası ile peynire dönüştürmüşlerdir (Çalım, 2007). Peynir, sütün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılarak peynir altı suyunun ayrılmasından sonra pıhtının kesilmesi ve tuzlanması ile elde edilen fermente bir süt ürünüdür (Kanak vd., 2018).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2020 Temmuz ayı süt ve süt ürünleri üretimi verilerine göre, inek sütünden peynir üretimi 60.544 ton ile bir önceki yılın Temmuz ayına göre %12.1 oranında artış gösterirken koyun, keçi, manda ve karışık sütlerden elde edilen peynir çeşitleri ise 3.367 ton üretimi ile %12.1 oranında azalma göstermiştir (TÜİK, 2020).

Laktik asit bakterisi (LAB) grubunda yer alan enterokoklar, fekal kaynaklı olmaları ve kötü çevre koşullarına karşı dayanıklılıklarından dolayı çoğunlukla su, bitki, toprak veya gıdalardan izole edilmektedirler (Giraffa, 2002).

İnsan ve hayvan bağırsak sisteminde doğal olarak bulunan özellikle et ve süt ürünlerinin doğal mikroflorasının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermentasyonunda doğal starter kültürler arasında yer almaktadır. Enterokokların suda bulunabilmeleri ve fekal kontaminasyonun bir indikatörü olarak kabul edilmelerinden dolayı diğer LAB aksine güvenli kabul edilen (GRAS) statüsünde değildirler. Ancak, enterokoklar lipolitik ve proteolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması ile bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıdalarda önem arz etmektedir (İşleroğlu vd., 2008). Enterokokların peynir teknolojisinde sağladığı yararların yanı sıra antibiyotik direnç genlerini genomunda veya plazmid olarak ihtiva etmesi kullanımlarını sınırlamaktadır.

Son yıllarda günümüzde artan antibiyotik tüketimi bakterilerin inaktivasyonunda çeşitli zorluklara neden olmaktadır. Doğuştan veya sonradan kazanılan antibiyotik

direnci bir mikroorganizmadan diğetine aktarılabilmektedir dolayısıyla bakteriler birlikte yaşadığı mikrofloranın diğeri üyelerini de etkileyebilmektedir. Antibiyotiklere karşı sonradan kazanılan direnç kromozomlarda değil, plazmidlerde saklanmaktadır. Bu da antibiyotik direncinin başka bakterilere konjugasyon yoluyla taşınmasını mümkün kılmaktadır (Armin vd., 2017). Enterokokların fırsatçı patojenler olmalarından dolayı geleneksel peynirlerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi gerekmektedir (İnoğlu, 2013).

Enterococcus cinsi bakterilerinin tanımlanmasında fenotipik ve serolojik analizlere dayalı geleneksel yöntemler ile genotipik yöntemler ve kütle spektrofotometresine dayalı modern yöntemler kullanılmaktadır. Klasik tanımlama yöntemlerinin özellikle 2000’li yıllardan itibaren kullanılmakta olan genotipik yöntemlere göre uzun sürmesi, türler arası varyasyonlar, tekrarlanabilirliğinin zayıf olması ve güvenilirliğinin düşük olması konusunda dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, klasik tanımlama yöntemleri DNA’ya dayalı moleküler yöntemlere göre istatistiksel ve metodolojik hata olasılıklarının yüksek olması dolayısıyla başta Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) olmak üzere genotipik tanımlama yöntemlerinin kullanılması uygun görülmüştür. Moleküler biyolojide kullanılan PZR temelli yöntemler, hücre içerisinde bulunan nükleik asitlerin uygun koşullar altında çoğaltıldığı bir tekniktir (Aydın, 2017).

Bu çalışmada, Aksaray ilinde üretilen Tulum peyniri örneklerinden enterokok suşları izole edilmiştir. Gram reaksiyon ve katalaz testi ile ön tanımlamaları yapılan izolatlar *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan suşların saflık kontrollerinin ardından PZR yöntemi ile tür düzeyinde tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Bu türlerin gıda kaynaklı risk taşıyıp taşımadıkları ise antibiyotiğe karşı dirençlilikleri ile belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Peynir

Süt ürünleri içerisinde en fazla tanınan gıdalardan biri peynir olup, Dünya’da 4000’den fazla peynir çeşidinin bulunduğu ifade edilmektedir. Peynir çeşitlerinin bir kısmının daha geniş kapsamlı ticari olarak üretildiği, bir kısmının ise geleneksel yöntemlerle yöresel olarak üretildiği bildirilmektedir (Koçak, 2014).

Peynir, üretildiği hammaddeye ve üretim şeklindeki farklılıklara bağlı olarak tüm dünyada çok eski zamanlardan beri çeşitli lezzet ve formlarda üretilen en önemli süt ürünlerindendir. Eski zamanlarda çabuk bozulan sütün değerlendirilmesi amacıyla yapılan peynir, günümüzde daha çok lezzeti ve besleyici özelliklerinden dolayı sevilerek tüketilmektedir. Hemen her çeşit sütün (örn; koyun, keçi, inek, manda) üretilen peynir, özellikle protein, vitamin ve mineral madde bakımından zengin bir gıdadır (Çalım, 2007; Sancak vd., 2018).

Peynir; yağlı süt, krema, kısmen veya tamamen yağı alınmış süt, yayık altı veya bunların birkaçının ya da tamamının karıştırılıp, peynir mayası (rennin) veya zararsız organik asitlerle pıhtılaştırıldıktan sonra, oluşan pıhtıdan peynir suyunun süzülmesi, telemenin şekillendirilmesi ve tuzlanmasıyla elde edilen, taze veya olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen bir süt ürünü olarak tanımlanmaktadır. Peynir çeşitliliği de bu aşamada uygulanan yöntemlere göre farklılık göstermektedir (Ardıç, 2003; Çalım, 2007).

Kültürel zenginliklere bağlı olarak Dünya’da ve Türkiye’de çok sayıda peynir çeşidi üretilmektedir. Ülkemizde endüstriyel olarak üretilen peynirlerin yanı sıra kendine has kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özelliklere sahip 50’den fazla yöresel ve bölgesel peynir çeşidi bulunmaktadır. Birçok ülkede çiğ sütün geleneksel yollarla telemesi haşlanarak veya haşlanmadan üretilen yarı sert veya sert tipte peynirler mevcuttur (Akaoğlu vd., 2017; Aydın, 2017). Geleneksel peynirlerin genellikle mayalama sıcaklığının biraz üzerindeki sıcaklık değerine kadar ısıtılıp, hemen soğutulularak mayalandığı ya da çiğ sütün üretildiği bilinmektedir (Karabıyıklı ve Erdoğmuş, 2019).

Çiğ süt sahip olduğu doğal mikrofloraya bağlı olarak pastörize süte kıyasla daha fazla miktarda tat ve aroma bileşenlerine sahiptir (Aydın, 2017). Geleneksel yöntemlerle elde edilen peynirlerde çiğ süt (inek, koyun, keçi vb.) kullanımı, peynir üretiminde ve depolanmasında kullanılan tekniklerin ve sürelerin farklı olması, coğrafi konuma özgü mikrofloranın farklılığı gibi birçok etkene bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu mikroflora sütün elde edildiği yöre koşulları, özellikle kültürel alışkanlıklar, hayvan tür ve ırklarının farklılığı, farklı üretim tekniklerinin kullanılması ile yakından ilişkilidir (Akaoglu vd., 2017). Bu sebeple sütün doğal mikroflorasında yer alan veya süte bulaşan mikroorganizmaların peynire geçtiği ve fermentasyon sırasında da geliştiği görülmektedir (Karabıyıklı ve Erdoğan, 2019).

Her ülkede çok farklı tiplerde peynir üretilmektedir. Ülkemizde üretilen peynirlerin oranları %60 Beyaz , %17 Kaşar , %12 Tulum ve Mihaliç peyniri olup kalan %11'i ise lor peyniri, Urfa peyniri, otlı peynir, çökelek peyniri gibi yöresel peynirler oluşturmaktadır (Koçak, 2014).

2.2 Tulum Peyniri

Tulum peyniri; telemenin ufalanıp, tuzlandıktan sonra tulumlara basılıp ve belirli bir süre olgunlaştırılmasıyla elde edilen bir peynir çeşidi olarak tanımlanmaktadır (Sert ve Akın, 2008). Değişik lezzet ve aromaya sahip olan tulum peyniri zengin protein, kalsiyum, yağ ve fosfor içeriğinden dolayı insanların sağlıklı ve dengeli beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Hızarcı, 2011). Ülkemizde yılda yaklaşık 45-50 bin ton tulum peyniri üretildiği tahmin edilmektedir.

Türkiye'nin sevilerek tüketilen geleneksel peynirlerinden olan tulum peynirleri; ülkenin birçok yerinde, özellikle de sütün modern işletmelerde değerlendirilemediği köy ve kasabalardaki küçük aile işletmelerinde üretilmektedir. Üretim daha çok sütün fazla olduğu Mart-Temmuz aylarında gerçekleştirilmektedir (Sancak vd., 2018).

Geleneksel olarak birçok çeşidi bulunan tulum peynirleri, kendine has duyuşal özellikleri (örn; beyaz-krem renkli, hafif asidik, tereyağı aromalı, yüksek yağ içerikli, sindirimi kolay, yarı sert olması) ile karakterize olup, üretimlerinde çoğunlukla koyun sütü kullanılmakla birlikte bunun yanında koyun sütüne, keçi veya inek sütü

de ilave edilerek üretilmektedir. Ancak son yıllarda inek sütünden tulum peyniri üretimi yaygınlaşmıştır (Çalım, 2007).

Tulum peyniri, ismini kullanılan ambalaj malzemesinden almaktadır ve olgunlaştırmada tulum olarak çoğunlukla yüksek dayanıklılığa sahip keçi derisi tercih edilirken, koyun derisi de kullanılmaktadır. Genellikle peynir tulumun iç kısmına doldurulmasına rağmen, Ege Bölgesinde kullanılacak derinin kılları tıraş edilip dış kısmı içe gelecek şekilde çevrilir ve peynir hava almayacak şekilde basılmaktadır (Sert ve Akın, 2008).

Üretimde kullanılan tulumların, gözenekli yapıya sahip olması nedeniyle su ve hava geçirgenliği oldukça fazladır. Tulum peynir üretiminde deriye alternatif olarak; tulum, bez, teneke, yarı sentetik kılıf, polietilen poşet, plastik bidon, cam kavanoz, tahta kutu gibi ambalajlama materyalleri de peynirlerin olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır (Çalım, 2007; Hizarcı, 2011). Daha kolay ve ucuz elde edilmesi, kullanım kolaylığı gibi nedenlerle genellikle plastik ambalajlar daha çok tercih edilmektedir. Tulum peynirlerinin olgunlaştırması bazı yörelerde ise çanak veya pişmiş topraktan yapılan testilerde gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Akyüz ve Gülümser, 1984).

İç Anadolu Bölgesi'nde de özellikle Kırşehir, Nevşehir, Niğde, Yozgat ve Aksaray illerinde yaygın olarak üretilmekte olup çanak veya çömlek peyniri olarak da isimlendirilmektedir. Bu peynirler üretim teknikleri ve olgunlaştırılma yöntemleri bakımından tulum peynirine benzerlikler göstermektedir. Olgunlaşma işlemi mağara, obruk, küçük doğal yapılarda ve mahzenlerde gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda olgunlaştırma işlemleri plastik bidonlarda gerçekleştirildiğinden bidon peyniri olarak da isimlendirilmektedir (Sert ve Akın, 2008).

Tulum peyniri her ne kadar endüstriyel düzeyde üretilse de yöresel olarak da farklı isimlerle anılan üretim şeklinde farklılıklar içeren varyeteleri de mevcuttur. Üretimde uygulanan teknikler ve üretildiği bölgelere göre farklılıklar gösteren tulum peyniri, genellikle Erzincan, Erzurum, Elazığ, Tunceli ve Bingöl'de Şavak tulum peyniri, Çorum, Kastamonu ve Çankırı'da Kargı tulum peyniri, Karaman ve Konya'da Divle tulum peyniri, Antalya ve çevresinde Çimi tulum peyniri ve Ege Bölgesi'nde de İzmir tulum peyniri olarak adlandırılmaktadır. Bitlis tulum peyniri de geleneksel

tulum peyniri çeşitlerinden olup, ülke genelinde çok fazla tanınmasada bölgede üretimi yaygın bir şekilde yapılan ve sevilerek tüketilen bir peynir çeşididir (Sancak vd., 2018).

Türkiye'de üretim yöntemi ve görünüşü itibariyle birbirinden oldukça farklılık gösteren kuru ve salamuralı olmak üzere iki tip tulum peyniri üretilmektedir. Kuru tulum peyniri; İç Anadolu, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri'nde, salamuralı tulum peyniri ise İzmir tulum peyniri olarak bilinmekte ve Ege Bölgesi'nde kıyıya yakın yerleşim merkezlerinde üretilmektedir (Sert ve Akın, 2008).

2.2.1 Tulum peynirlerinin özellikleri

Ticari ya da geleneksel olarak üretilen tulum peyniri, Türkiye'de çok üretilen peynir çeşitlerinden olmasına rağmen, üretiminde standart bir teknik uygulanmadığı için farklı bileşim ve özelliktedir. Bu sebeple fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri farklılık göstermektedir (Hizarcı, 2011).

Tulum peyniri üzerine yapılan birçok çalışmada; *Leuconostoc mesenteroides* subspecies *cremoris*, *Leu. mesenteroides* subspecies *dextranicum*, *Lactobacillus casei* subspecies *casei*, *Lb. plantarum* ile *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*, *Lc. lactis* subspecies *cremoris*, *Lc. casei* subspecies *casei* ve *Lc. lactis* türlerinin olgunlaşmada ve karakteristik tat oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur (Tatlı, 2009).

2.2.1.1 Kimyasal özellikleri

Tulum peyniri üretiminde bölgelere göre farklılık gösteren sütün türü, bileşimi, olgunlaşma koşulları ve üretim yöntemlerindeki farklılık, elde edilen peynirlerin kimyasal özelliklerini de değiştirmektedir (Gün, 2012).

Tulum peynirinin kimyasal bileşimleri; rutubet %40-45, kuru maddede yağ %51.6-58.9, kuru maddede tuz miktarı %3-6 (w/w) arasında kabul edilebilir değerde, pH'sı 4.8-5.2 arasında ve asidik tattadır (Hizarcı, 2011). Araştırmacılar tarafından yapılan çeşitli tulum peyniri örneklerinde tespit edilen kimyasal analiz bulguları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Tulum peynirlerinin kimyasal bileşimi, pH ve Asidite değerleri.

Rutubet (%)	Protein (%)	Km Yağ (%)	Km Tuz (%)	Kül (%)	pH	Asidite (%)	Kaynak
37.29	21.54	34.96	4.66	5.50	-	1.66	(Akyüz, 1981) ¹
39.16	26.61	25.54	11.92	6.68	-	-	(Akyüz ve Gülümser, 1984) ²
44.50	24.56	25.73	3.26	-	-	1.82	(Arıcı ve Şimşek, 1991) ³
37.02	-	-	4.82	-	5.11	1.14	(Ateş ve Patır, 2000a) ⁴
34.16	-	-	5.02	-	6.20	0.58	(Ateş ve Patır, 2000b) ⁵
43.15	-	41.58	5.99	4.92	-	1.41	(Bostan, 1991) ⁶
38.19	27.44	26.60	5.96	7.84	-	2.60	(Eralp, 1967) ⁷
42.98	-	21.33	3.01	3.78	5.41	0.49	(Keleş ve Atasever, 1996) ⁸
-	24.80	24.28	4.74	-	-	1.83	(Kılıç ve Gönç, 1990) ⁹
35.93	-	-	10.41	-	5.52	1.36	(Patır vd., 2001) ¹⁰
35.46	-	43.49	5.29	6.52	5.30	0.57	(Şahin, 1997) ¹¹
54.06	19.17	46.66	6.57	-	4.47	0.76	(Şengül, 1995) ¹²
57.75	-	26.17	3.48	5.07	5.38	1.46	(Tarakçı vd., 2005) ¹³
42.87	21.28	50.19	10.26	7.22	-	1.54	(Yaygın, 1971) ¹⁴

1: Şavak tulum peyniri

2: Yozgat çanak peyniri

3: Starter kültür kullanılan tulum peynirleri

4: Deneysel tulum peynir üretimi (90 gün olgunlaştırılmış, ısı işlemi görmüş süt %2 starter kültür katkılı, olgunlaşmanın 60. günü)

5: Deneysel tulum peynir üretimi (60 gün olgunlaştırma, çiğ süt)

6: Piyasa (plastik bidonda)

7: İzmir salamura tulum peyniri

8: Divle tulum peyniri

9: İzmir salamura tulum (deri) peyniri

10: Deneysel geleneksel tulum peyniri üretimi (90.gün)

11: Aksaray çömlek peyniri

12: Deneysel Tulum peyniri üretimi (Tahta Ambalaj)

13: Cam kavanozlarda 90. gün olgunlaştırma

14: İzmir salamura tulum peyniri

2.2.1.2 Mikrobiyolojik özellikleri

Geleneksel yöntemlerle veya endüstriyel boyutta üretilen tulum peynirlerinde, kendisine özgü yapı, tat ve aroma kazanması için çiğ süt veya düşük sıcaklıklarda kısa süre ısıtıl işlem gören (65-68°C/2-5 dk.) sütlerin kullanılması, aynı zamanda insan sağlığı açısından risk oluşturan patojen mikroorganizmalar ve peynir kalitesini etkileyerek ekonomik kayıplara neden olan saprofit mikroorganizmaların gelişimini de desteklemektedir. Dolayısıyla üretimde kullanılan sütün doğal mikroflorası ile peynir yapımı ve olgunlaşması esnasında bulaşabilen saprofit ya da patojen özellik taşıyan çeşitli mikroorganizmalar tulum peynirinin mikroflorasını oluşturmaktadır (Çalım, 2007; Gün, 2012). Araştırmacılar tarafından yapılan çeşitli tulum peyniri örneklerinde tespit edilen mikrobiyolojik analiz bulguları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tulum peynirleri üzerine yapılan mikrobiyolojik analiz bulguları.

Genel Canlı (Kob/g)	Laktobasil (Kob/g)	Laktik-streptokok (Kob/g)	Staphylococcus (Kob/g)	Koliform (Kob/g)	Maya-Küf (Kob/g)	Kaynak
3.7x10 ⁸	-	2.2x10 ⁸	-	7.7x10 ³	1.1x10 ⁶	(Bostan, 1991) ¹
6.3x10 ⁸	7.40x10 ⁸	-	1.0x10 ⁴	0 ^a	8.0x10 ⁴ -1.8x10 ⁵	(Bostan ve Uğur, 1992) ²
7.43-8.05	7.24-7.71	-	4.51-5.84	2.50-4.35	4.49-6.54	(Çalim, 2007) ³
1.8x10 ⁹	1.15x10 ⁷	-	-	3.6x10 ⁶	1.15x10 ⁷	(Dıǧrak vd., 1994) ⁴
6.60	6.36	-	-	1.23	2.78	(Kara ve Akkaya, 2015) ⁵
9.45x10 ⁷ -2.97x10 ⁸	3.88x10 ⁷ -4.94x10 ⁸	-	-	9.53x10 ⁴ -2.53x10 ⁵	8.07x10 ⁴ -6.97x10 ⁵	(Keleş, 1995) ⁶
9.35	6.93	-	-	2.37	7.00	(Kıvanç, 1989a) ⁸
2.13x10 ⁹	8.56x10 ⁶	-	-	3.20x10 ⁶	1.87x10 ⁶	(Kurt vd., 1991) ⁹
6.78 ± 1.42	6.93 ± 1.17			3.04 ± 1.52	6.36 ± 1.43	(Morul ve İşleyici, 2012) ¹⁰
7.1x10 ⁷	5.6x10 ⁷	3.2x10 ⁷	4.4x10 ⁵	9.8x10 ⁶	2.9x10 ⁵	(Patır vd., 2000) ¹¹
8.41	5.86	-	5.13	7.01	4.15	(Patır vd., 2001) ¹²
9.9x10 ⁷	8.3x10 ⁷	1.6x10 ⁷	-	1.5x10 ⁵	1.7x10 ⁷	(Şahin, 1997) ¹³
1.1x10 ⁸	-	-	3.3x10 ⁷	<10-3.5x10 ⁵	1.7x10 ⁵	(Şengül, 2001) ¹⁴
9.11	8.039	-	-	21.18	1.10x10 ⁵	(Şengül vd., 2001) ¹⁵
7.01	5.96	-	-	1.95	3.52	(Tarakçı vd., 2005) ¹⁶

1: Tulum peyniri (plastik ambalaj, ortalama değer)

2: Tulum peyniri (Çiğ süt, 90 gün olgunlaştırma, ortalama değer) a: 60.günden sonra üreme gözlenmemiştir.

3: Tulum peyniri (deri, bez, bidon)

4: Şavak Tulum peyniri

5: Afyon Tulum peyniri

6: Deneysel peynir (90 gün olgunlaştırma)

7: Divle Tulum peyniri (ortalama değer)

8: Şavak Tulum peynir (ortalama değer)

9: Erzincan Tulum peyniri (ortalama değer)

10: Divle Tulum peyniri

11: Tulum peyniri (Çiğ süt)

12: Tulum peyniri (Çiğ süt, 90 gün olgunlaştırma)

13: Aksaray çömlük peyniri

14: Tulum peyniri (ortalama değer)

15: Tulum peyniri (Çiğ süt)

16: Tulum peyniri (Cam kavanoz, 90 gün olgunlaştırma)

2.3 Enterokoklar

Doğada yaygın olarak bulunan enterokoklar, insan ve hayvanların sindirim sisteminde baskın mikrofloranın üyesi olup, topraktan, yüzey sularından, bitkilerden ve çeşitli fermente gıdalardan sıklıkla izole edilmektedir (İnoğlu, 2013).

Enterokoklar Thiercelin tarafından 1899 yılında bağırsak bakterisi olarak tanımlanmıştır. 1906 yılında Andrews ve Horder tarafından *Streptococcus faecalis* olarak adlandırılmıştır. Lancefield tarafından ise 1933 yılında D grup fekal streptokoklar içinde serolojik bir tiplendirme sistemi geliştirilmiş ve bu gruba dâhil edilmiştir (Şentürk, 2017).

Enterokoklar ilk kez DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda *Streptococcus* cinsinden ayrılmıştır. 1984 yılında ayrı bir cins olarak kabul edilen enterokokların bu ayrılma ile diğer Gram pozitif koklardan ve laktokoklardan farklı olduğu görülmüş ve 16S rRNA analizleri ile bu farklılık doğrulanmıştır. *Streptococcus* cinsi; *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere 3 cinse ayrılmıştır. *Enterococcus* cinsi içinde; insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde, bazı fermente gıdalarda ve geniş tabiatta bulunan fekal streptokoklar, *Lactococcus* cinsi içinde; patojen olmayanlar, *Streptococcus* cinsi içinde; *Staphylococcus thermophilus* ve patojen türler toplanmıştır (Demir, 2014; Toğay ve Temiz, 2011; Yoğurtçu, 2011).

Günümüze kadar *Enterococcus* cinsi üyesi 32 tür tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları; *E. avium*, *E. asini*, *E. azikeevi*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. porcinus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. columbae*, *E. phoeniculicola*, *E. raffinosus*, *E. rottiae*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius* *E. malodoratus* ve *E. villorum*’dur (Yoğurtçu, 2011). 16S rRNA dizilimi dikkate alındığında enterokoklar 4 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.3. Enterokok grubuna ait bakteri türleri.

Grup	Bakteri Türleri
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. pseudoavium</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. columbae</i> , <i>E. cecorum</i>

Diğer enterokok türlerinden gruba dâhil edilmeyen türleri *E. flavescens*, *E. seriolicida*, *E. dispar*, *E. sulfurous*, *E. saccharolyticus* ve *E. faecalis* ise bireysel olarak sınıflandırılmıştır (Nalvuran, 2013).

Enterokoklar; Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, tek, diplokok veya kısa zincir şeklinde, *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* gibi bazı türleri dışında hareketsiz, fakültatif aerobik bakterilerdir. Enterokok türlerinin optimal gelişim sıcaklığı 37 °C olup, 60 °C’de 30 dakika uygulanan ısıt işlemlerde canlılıklarını sürdürmektedirler. Genellikle %6.5 NaCl konsantrasyonunda, pH 4-9.6 gibi geniş bir aralıkta, 10-45 °C’de ve hatta 50 °C’de bile gelişebilmektedir (Özlü, 2015; Şentürk, 2017; Tatlı, 2009). Enterokoklar bu özelliklerinden dolayı başta peynir olmak üzere bazı fermente gıdaların mikrobiyotasında bulunmaktadır. Bu sebeple enterokok türlerinden *E. faecium* ve *E. faecalis*’in bazı gıdalarda fekal kontaminasyonun indikatörü olarak değerlendirilirken, *E. faecalis*’in pek çok gıda da yaygın olarak bulunmasının her zaman direkt fekal kontaminasyon göstergesi olmaması gerektiği bildirilmektedir. Ancak enterokokların yalnızca gıdalarda yetersiz hijyen ve sanitasyon göstergesi olarak değil gıdanın bir parçası olarak da değerlendirilmesi gerekmektedir (Toğay ve temiz, 2011).

Geleneksel yollarla çiğ veya pastörize sütün üretilen peynirde enterokok varlığı, sağım sırasında dışkı ile bulaşmış olan hayvan memesinden ya da alet ve ekipmandan süte bulaşarak telemeye oradan da peynire geçmektedir. Enterokokların peynirde bulunan popülasyonları oldukça heterojen bir yapı göstermektedir. Taze peynirlerde başlangıçta 10^4 - 10^6 Kob/g arasında bulunan enterokok, olgunlaşmış peynirlerde ise tuz ve asitlik toleranslarına göre 10^5 - 10^7 Kob/g arasında değişmektedir. Aynı zamanda pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olmalarının yanında, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonu, farklı substrat, düşük ve yüksek sıcaklıklarda gelişim koşullarına adaptasyon sağlaması geleneksel peynirlerde

olgunlaşma aşamasında sayıca logaritmik artışa neden olmaktadır (Aydın, 2017; Gürsoy ve Kınık, 2006).

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türlerinin peynirde yüksek sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir. Enterokoklar proteolitik ve esterolitik aktivitelerinin yanı sıra sitrat metabolizması yetenekleri ile peynirlerde tat oluşumu ve olgunlaşma sırasında duyuşal özelliklerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Tatlı, 2009).

Enterokoklar, süt ürünleri üretiminde starter kültür olarak kullanılması, bakteriyosin üretimi ve probiyotik yeteneği gibi önemli biyoteknolojik özelliklere sahiptirler. Probiyotik olarak kullanılmakta olan suşların genellikle insanların gastrointestinal sisteminden izole edilmekte ve bunlar *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerine aittir. Son zamanlarda enterokoklarda probiyotik olarak kullanılmaya başlanmış olup, üzerinde en fazla çalışılan *E. faecalis* SF68 suşudur. Bu suşun *S. thermophilus* ve *E. faecium* kullanılarak üretilen probiyotik ürünün, çocuklarda görülen diyarenin önlenmesi, yetişkinlerde diyare septomlarının süresini kısalttığı ve dışkılama zamanını düzenlediği öne sürülmüştür.

Ayrıca kolesterol seviyesini kısa sürede azaltırken, uzun sürede düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol seviyesinin düşmesinde etkili olmadığı görülmüştür (Dağdemir ve Özdemir, 2006).

Bazı LAB insan sağlığı üzerinde probiyotik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bu etkiler arasında antibiyotik kaynaklı diyarenin, laktoz intoleransının, gıda alerjilerinin ve biyojenik aminlerin oluşumunun önlenmesi, kalp hastalıklarının tedavisi, kolesterolün kontrolü ve anti-kanserojen hareketin uyarılması yer almaktadır. Ancak laktik asit fermentasyonunun, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, bazı hastalıkların oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Örneğin, fermentasyon sırasında üretilen D(-) laktik asit potansiyel olarak asidoz oluşumu nedeniyle yetersiz beslenen ve hasta çocuklar için zehirli olabilmektedir. Ayrıca bu bakterilerin üretrit, endokardit, endometrit, pnömoni, artrit, bakteriyemi ve menenjit gibi klinik infeksiyonları ile ilişkili olabileceği de ileri sürülmektedir. Bunlara ek olarak *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Lactobacillus* cinsine ait bazı türlerin dış çürümelerine neden olabileceği ifade edilmektedir (Özlü, 2015).

İnsanlarda çeşitli infeksiyonlara neden olan enterokok türleri bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar genellikle üriner sistem ve yara infeksiyonlarının yanı sıra; yumuşak doku, safra sistemi, karın içi, endokardiyum ve damar içi infeksiyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca enterokoklar kulak, göz, periodontal dokular, sinüsler, akciğer ve merkezi sinir sistemlerini enfekte edebilme özelliğine sahiptirler fakat bu infeksiyonlar nadir gözlenmektedir. Enterokok türlerinden *E. faecalis*'in insan ve hayvanlardaki enterokokal infeksiyonun %80-90 oranında sorumlu olduğu ve bu oranın diğer türlere göre on kat fazla olduğu görülmüştür. Geriye kalan infeksiyondan sorumlu enterokok türü ise *E. faecium*'dur. Diğer enterokokal türlerinden *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. mundtii* ve *E. solitarius* nadiren insanlarda infeksiyonlara neden olmaktadır.

Enterococcus suşları gıdalarda probiyotik veya starter kültür olarak kullanılmaktadır ancak gıda güvenliği açısından üzerinde birçok araştırma yapılan enterokok türlerinin probiyotik veya starter kültür olarak kullanılabilmesi için virülans özellikleri taşıyıp taşımadıkları, hemoliz oluşturmaları, glikopeptidlere ve diğer antibiyotiklere direnç mekanizmasının bilinmesi de gerekmektedir. Bu bakteriler mutlak patojen olarak bilinmezler ancak özellikle insan bağışıklığını tehlikeye atan fırsatçı patojen olarak bilinen bakteriler içinde tanımlanmaktadır. Starter olarak kullanılan *Enterococcus* türleri ile hastalık yapıcı *Enterococcus* türlerinin birbirleriyle karıştırılmamasına rağmen bu mikroorganizmaların probiyotik veya starter kültür olarak, gıda zincirine girecek suşlarının seçilmesinde dikkatli olmayı gerektirmektedir (Şentürk, 2017; Tatlı, 2009).

2.4 Mikroorganizmalarda Antibiyotik Dirençlilik

Canlıların gelişmesini durdurma veya öldürme gücü bulunan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan doğal ya da kimyevi maddelere antibiyotik denir (Şentürk, 2017).

Antibiyotik üretimi mikroorganizma için seçici bir avantaj sağlar. Örneğin, *Penicillium* cinsine ait bazı türler tarafından üretilen antibiyotikler, doğada rekabet halinde olduğu diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek *Penicillium* cinsine ait türlere önemli bir avantaj sağlamaktadır (Özteber, 2013).

Antibiyotik direnci, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanabilir. Son zamanlarda insanlarda ve hayvanlarda bilinçsiz ve gereksiz antibiyotik kullanımı antibiyotik direnç gelişimine ve yayılımına olanak sağlamaktadır. Antibiyotik kullanımının hızlı bir şekilde artmasıyla beraber yıllar içinde farklı ve gittikçe artan antibiyotiğe dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır. Ancak antibiyotiğin kullanılmadığı 1940'lı yıllarda, bazı adalardaki toprak ve dışkı örneklerinde streptomisin ve tetrasiklin dirençli bakterilerin bulunduğu bildirilmektedir. Bunun sonucunda antibiyotik dirençliliğin yalnızca yaygın olarak kullanılmakta olan antibiyotiklere bağlı olmadığı ve bakterilerin olumsuz çevre şartlarında canlılığını sürdürmek için kullandığı savunma sisteminin bir parçası olduğu da belirtilmektedir.

Antibiyotik direnci, gerek toplumsal gerekse hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde halen sorun oluşturmakta ve bu sorun her geçen gün artarak karşımıza çıkmaktadır (Tatlı, 2009). Enterokoklarda antibiyotik dirençliliğinin gelişmesinde en önemli faktörlerden birisi de antibiyotiklerin hayvansal gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımının yaygınlaşmasıdır. Ayrıca, besi hayvanlarında büyümeyi artırıcı ilaçların sık kullanımı da hayvansal gıdalardan izole edilen enterokoklarda antibiyotik dirençliliğinin artmasına neden olmuştur.

Antibiyotiklerin kontrolsüz bir şekilde hayvan beslenmesinde gelişmeyi artırıcı ajan olarak kullanılması, antibiyotiklere dirençli *E. faecium* türlerinin ortaya çıkmasında selektif bir ajan rolü taşımaktadır. Klinik uygulamalarda kullanılan antibiyotiklere karşı kazanılan direncin bir diğer mekanizması olarak da, bu antibiyotiklerin hayvan beslenmesinde bilinçsiz kullanımı sonucu gelişen çapraz direnç olarak değerlendirilmektedir (Şentürk, 2017).

LAB mutasyon yoluyla farklı direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına yardım eder. Ayrıca, LAB çevredeki diğer bakterilerden de direnç kazanabilir. Bir LAB bir kez dirençli hale geldiği zaman, direncin determinantı çoğalır ve diğer bir konağa aktarılabilir. Bu yüzden, starter suşlarda, yem ve gıda katkısı olarak kullanılan bakterilerde “transfer edilebilir antibiyotik direnci”nin işaretlerini aramak, bu suşların teknolojik ve fizyolojik özelliklerini belirlemek kadar önem arz etmektedir (Özteber, 2013).

Fermente gıdalarda ve gastrointestinal sistemde oldukça fazla miktarda bulunan LAB antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları kadar direnç genlerini barındırmaları ve aktarmaları da önemlidir. Bu incelenen tür, suş ve antimikrobiyal ajanın çeşidine göre değişmektedir. LAB birçok türü doğal olarak plazmid taşır. Bu plazmidler çoğunlukla bakterinin metabolik aktivitesi için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşırlar. Ancak bazı türler bu genlerin yanı sıra çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeyi sağlayan genleri taşıyan plazmidleri de içerirler. Bu bakteriler çeşitli gıdalarda değişik amaçlar için kullanıldığında potansiyel direnç taşıyıcı ve aktarıcı olarak iş görebilirler (Demir vd., 2018).

Birçok çalışma sadece patojen bakterilerin değil ayrıca çeşitli LAB gibi ticari öneme sahip bakterilerinde antibiyotik direnci taşıdığı ve bu direncin yayılmasında etkili olduğunu göstermektedir (Demirel ve Gürler, 2016). Bu durum antibiyotiklerin yemlerde, ziraat ve veteriner uygulamalarında yanlış ve aşırı kullanımından dolayı daha zararlı bir hale gelmiştir. Bu döngü içerisinde fermente süt ürünlerinin insanlar tarafından tüketildiği göz önüne alınırsa antibiyotik direncinin önemli bir konu olduğu daha açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Özteber, 2013).

LAB her ne kadar patojen özellik göstermeyen laktobasiller, leukonostoklar ile laktokoklar antibiyotik direnci gösterse de bunların arasından enterokoklar fırsatçı patojen olmalarından ve doğada çok yaygın olarak bulunmasından dolayı antibiyotik direnç çalışmalarında daha ön planda kalmıştır (Demir vd., 2018).

Son zamanlarda vankomisine dirençli enterokok (VRE) olgularındaki artış, araştırmacıları direnç genlerince kodlayan proteinlerin yapılarını ve işlevlerini daha kapsamlı şekilde çalışmaya itmiş ve yüksek düzey glikopeptid direncine sahip enterokok suşlarının fenotipik özelliklerini kodlayan genetik bilgilere ulaşmayı kolaylaştırmıştır. Bu bilgiler ışığı altında VRE, sadece vankomisin ya da çoklu antibiyotik direnci taşıması ve diğer bakterilere aktarabiliyor olması, direncin indüklenebilir veya yapısal olması ile diğer birçok etmene istinaden *VanA*'dan *VanG*' ye kadar isimlendirilirler. Bu glikopeptid direnç tipleri içerisinde en iyi tanımlanmış olanları *VanA*, *VanB*, *VanC* ve *VanD* cinsleridir (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

Vankomisin direnci oldukça önem arz etmektedir. Çünkü bu antibiyotik çok yönlü enterokokal infeksiyonların tedavisinde sıklıkla başvurulmuş kuvvetli bir ajandır. Ampisilin, vankomisin ve gentamisin, çoklu antibiyotiğe dirençli enterokokların tedavisinde klinik olarak en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Son yirmi yılda vankomisinin yaygın kullanımı sonucu VRE suşlarının sayısında ve dolayısıyla da yüksek vankomisin direncine sahip hastahane kaynaklı enterokokların invazyon oranında artış görülmüştür. VRE suşları, bütün antienterokokal ilaçlara karşı da direnç göstermekte ve bu nedenle önemli bir risk grubunu oluşturmaktadır (Ahmed ve Baptiste, 2018).

Gıdalardan izole edilen enterokokların antibiyotik dirençlilik özelliklerine ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalarda starter kültürler, yöresel peynirler ve süt ve süt ürünlerinden izole edilen bazı enterokok suşlarının klindamisin, tetrasiklin, streptomisin, gentamisin, eritromisin, kanamisin, kloramfenikol ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olabildiği belirtilmiştir (Nalvuran, 2013; Ayhan vd., 2020; Tuncer vd., 2013).

2.4.1 Antibiyotik direnç gelişimi

Bakterilerde antibiyotiklere karşı doğal ve kazanılmış olmak üzere iki farklı direnç vardır (Demirel ve Gürler, 2016). Bazı bakteriler antibiyotiklere doğal olarak dirençli olabilmektedir. İlaç kullanımı ile ilişkisi olmayan bu tür direnç bakterilerinin temel özelliğidir ve kalıtsal değildir. Doğal direnç, bu mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşınamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşmamasının bir sonucudur. Örneğin ilacın dış membrandan geçmemesi nedeniyle Gram negatif bakteriler, vankomisine doğal olarak dirençlidir (Tatlı, 2009).

Bakteriler genetik özelliklerindeki değişimler sonucu eskiden duyarlı olduğu bir antibakteriyel maddeden etkilenmemeye başladığı durumda, bakteri antibakteriyel maddeye karşı direnç kazanmış olur. Çeşitli fiziksel ya da kimyasal etkilerle bakteri hücrelerinde oluşan değişimler sonucu, hücrenin antibiyotiklere karşı davranışı değişebilir, geçirgenliği azalabilir ya da hücredeki antibiyotiğin hedefi değişebilir.

Kazanılmış (ektrensek) direnç genellikle enterokokların DNA'sında oluşan mutasyonlar sonucu veya patojenite adaları, konjugasyon, transformasyon, transpozonlar aracılığı ile plazmid DNA aktarımı sonucu görülmektedir. En sık görülen mekanizma ise konjugasyondur. Bir bakteriden aktarılan direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile yavru hücrelere de aktarılır. Bu hücrelerin çoğalması ile de dirençli suşun ve direnç genlerinin yayılımı gerçekleşir. Enterokoklar vankomisine, kloramfenikole, eritromisine, tetrasikline, florokinolona, beta laktamaz üreten penisilinlere, yüksek seviye aminoglikozitlere ve klindamisinlere karşı ise sonradan ektrensek direnç göstermektedirler (Şentürk, 2017).

Bu genetik değişiklikler, bakterinin savunma sistemini değiştirerek şekillenir. Bunlar; antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişiminden, hücre duvar geçirgenliğinin azalmasından, antibiyotiğin enzimatik yıkımından, aktif transport sistemini değiştirmesinden kaynaklanmaktadır.

Direnç oluşumunda rol oynayan genler, antibiyotiklerin uzun süre klinik kullanımı sonucu gelişebilmektedir. Bu direnç, antimikrobiyel madde üretiminden sorumlu olan bölgenin bu maddelere karşı kendini koruyan direnç genlerinin aktarılmasıyla şekillenebilmektedir (Demirel ve Gürler, 2016).

Antibiyotiğe karşı doğal ve kazanılmış çeşitli direnç mekanizmaları gösteren enterokoklar; yarı sentetik penisilinlere, düşük düzeyde aminoglikozitlere, linkozamitlere ve streptograminlere karşı doğal direnç gösterirken, plazmidler, integronlar ve transpozonlar aracılığıyla birçok antibiyotiğe karşı da direnç kazanabilmektedir (Şentürk, 2017).

2.4.2 Antibiyotik direnç aktarımı

Fermente gıdalarda ve gastrointrestinal sistemde oldukça fazla miktarda bulunan LAB mutasyon yoluyla farklı direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına neden olur. LAB birçok türü doğal olarak plazmid taşır. Bu plazmidler çoğunlukla bakterinin metabolik aktivitesi için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşırlar. LAB bazı türleri bu genlerin yanı sıra çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeyi sağlayan taşıyıcı plazmidleri de içerirler.

Ayrıca, LAB çevredeki diğer bakterilerden de direnç kazanabilir. Bir LAB bir kez dirençli hale geldiği zaman, direncin determinantı çoğalır ve diğer bir konağa aktarılabilir. Bu bakteriler çeşitli gıdalarda değişik amaçlar için kullanıldığında potansiyel direnç taşıyıcı ve aktarıcı olarak iş görebilirler (Alp ve Öner, 2014). Bu yüzden, starter suşlarda, yem ve gıda katkısı olarak kullanılan bakterilerde “transfer edilebilir antibiyotik direnci”nin işaretlerini aramak, bu suşların teknolojik ve fizyolojik özelliklerini belirlemek kadar önemlidir (Özteber, 2013).

Bakteriler ‘Yatay Gen Transferi’ ile antibiyotik direnci kazanabilirler. Bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türe ait başka bir bakteriye hatta farklı türdeki bakterilere dahi taşınabilir. Bakteride rekombinasyon olayları üç ana mekanizma ile meydana gelmektedir: Transformasyon, Transdüksiyon ve Konjugasyon (Özdam, 2016).

LAB ile diğer bakteriler arasındaki aktif/pasif iletişim sonucu konjugatif plazmidler ve transpozonların aktarılması ile direnç geni kazanması söz konusudur. LAB plazmidleri farklı büyüklüklerde, fonksiyonlarda ve dağılımlarda bulunmaktadır (Özteber, 2013).

Bir hücreden diğerine transfer edilebilen DNA parçaları olan “dirençli plazmidlerin” üretimi ile bazı durumlarda direnç bir bakteriden diğerine geçebilir. Antibiyotiği inaktif hale getiren veya etkisini azaltan enzimler bir hücrenin antibiyotiğe direnç kazanmasında önemli bir mekanizmadır. Bunların dışında; penetrasyonun azaltılması veya antimikrobiyal bileşiğin aktif olarak ekstrüde edilmesi ile antibiyotiğin hedef bölgeye ulaşmasının engellenmesi, hedef bölgelerin atlanması veya değişmesi, duyarlı hücrelerin daha dirençli hücre tipine dönüşerek gösterdiği adaptif cevap ve bakteri zarlarının geçirgenliğinin azalması da antibiyotik direnç mekanizmalarındandır (Demir vd., 2018).

Enterokoklarda kazanılan direnç, ya mutasyonlar ya da daha çok yabancı DNA kazanımı ile olur. Enterokokların, direnç genlerini diğer bakterilere aktararak yayabilmek için kullandıkları pek çok genetik aktarım sistemleri mevcuttur. Bu sistemler içerisinde; çok sayıda Gram-pozitif (*Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.) türde de replike olabilen plazmidler, *E. faecalis* türleri arasında bazı durumlarda transfer sıklığı %100’e yaklaşan ve plazmid kopya sayısının

belirlenmesinden sorumlu olup stabiliteleri oldukça yüksek olan seks feromon-cevap plazmidleri ile genetik materyal üzerinde DNA'nın bir bölgesinden diğerine hareket edebilen, özelleşmiş, konjugatif tipte hareketli genetik elemanlar olan transpozonlar mevcuttur. Bunun yanı sıra enterokoklarda; kromozomlar veya plazmidler üzerinde bulunan transpozonlar ile yeni bir konak bakteriye direnç genini entegre olarak aktarıldığı da gösterilmiştir (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

2.5 Enterokoklarda Tanımlama Yöntemleri

Enterokok bakterilerinin tanımlanmasında çoğunlukla fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bakterilerin tanımlanmasında ilk olarak morfolojik ve fizyolojik özellikleri dikkate alınmıştır. Daha doğru sonuçlar elde etmek için bu özellikler üzerine çeşitli düzenlemeler yapılmış ancak birbirine çok yakın türlerin ayırımına olanak sağlamamıştır. Bu nedenle fenotipik yöntemlere göre enterokok bakterilerinin tiplendirilmesinde daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Yerlikaya, 2014).

2.5.1 Moleküler yöntemeye dayalı tanımlama

Moleküler yöntemlerde, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak cins, tür, alt tür ve hatta suş düzeyinde tanımlama yapılabilmekte olup çok yakın türlerin de ayırımında kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı moleküler yöntemlerin son derece güvenilir, tekrarlanabilir, hızlı ve ucuz olması, kültür koşullarından etkilenmemesi ve sonuçların genellikle kolay yorumlanabilmesi bakımından fenotipik yöntemlere göre avantajlar sunmaktadır. Bu nedenlerle, başta PZR olmak üzere moleküler yöntemler bu tür avantajları gidermede kilit rol oynamaktadır (Özlü, 2015).

2.5.1.1 PZR yöntemine dayalı tanımlama

Mullis vd. (1984) PZR metodu, hücre içerisinde bulunan DNA biyomolekülünün istenilen gen bölgesinin hücre dışında uygun koşullar altında enzimatik olarak çoğaltıldığı bir tekniktir. Başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilirken günümüzde tek bir genden milyonlarca DNA kopyası çoğaltılabilmektedir (Yelboğa ve Karagüler, 2012).

Enterokok bakterilerinin tanımlanmasında çoğunlukla kullanılan moleküler yöntemler PZR temelli yöntemler ve PZR temelli olmayan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. En çok kullanılan PZR temelli yöntemlerde 16S rRNA'ya dayalı dizi analizleri yer almaktadır (Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

16S olarak adlandırılan ve nesillerce korunan bu bölge her bir bakteri türüne özgüdür ve bakterilerin jenerasyonu için gereklidir. 16S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içermektedir. Bu yüzden 16S rRNA kodlayıcı genlerinin dizileri o organizmanın taksonomik grubunu belirlemekte ve çok yakın türlerin ayrımında bile kullanılabilir. Bununla birlikte, filogenetik olarak birbirine bağlı izolatlar arasında genetik ilişkiyi yansıtmaları bakımında oldukça önemlidir. Ek olarak 1500 baz çifti (bp) uzunluğuna sahip olan bu bölge sekanslama işlemi açısından da bir avantaj sağlamaktadır (İspirli, 2016; Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu tez çalışması kapsamında Aksaray ili ve çevre köylerde geleneksel yollarla üretilen 22 adet tulum peynir örneği, materyal olarak kullanılmıştır. Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen örnekler, analiz yapılncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Analizler Aksaray Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2 Metot

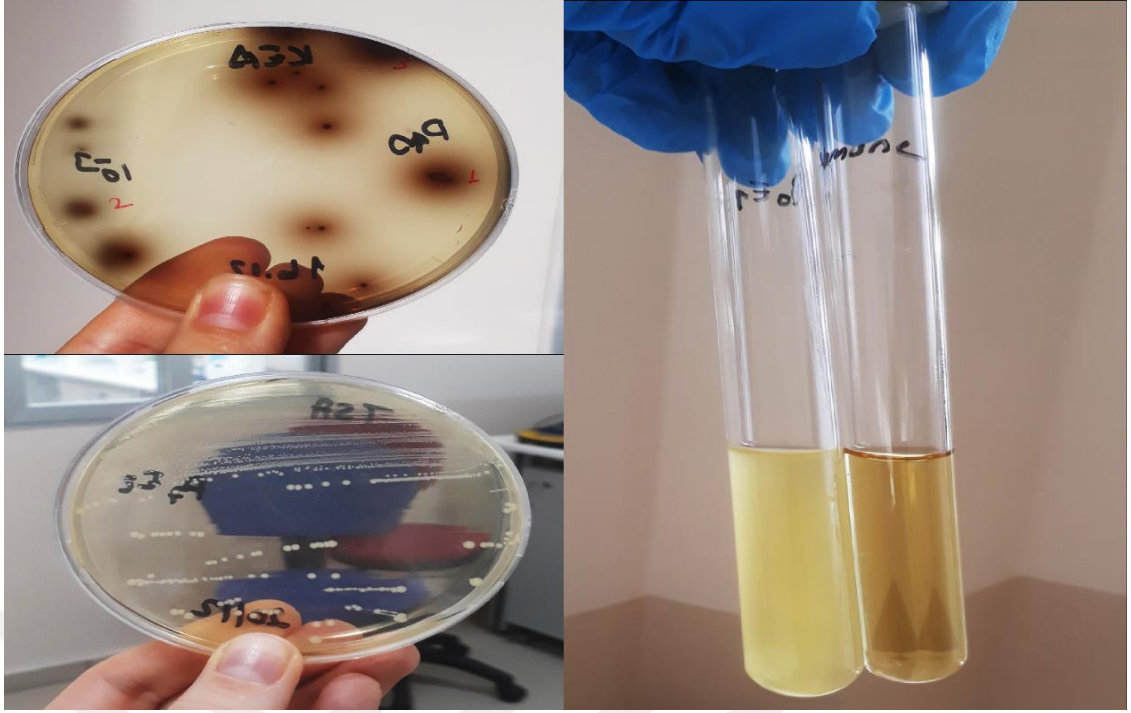
3.2.1 Enterokok suşlarının izolasyonu ve saflaştırılması

3.2.1.1 Enterokok suşlarının izolasyonu

Enterococcus suşlarının izolasyonu için tulum peyniri örneklerinden aseptik koşullar altında 10 g peynir örneği tartılmış, 90 mL steril ¼ kuvvetinde Ringer solüsyonu ile stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örneklerin 10⁻⁷’ye kadar dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan mikropipet yardımıyla 0.1 mL alınarak Kanamycin Esculin Azide Agar’a (KEA)(Merck, Darmstadt, Almanya) yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimden sonra petri kutuları 37 °C’de aerobik şartlar altında 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerde, görülen zeytin yeşili/siyah arası renkte ve etrafı berrak zon olan koloniler muhtemel enterokok olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.2 İzolatların saflaştırılması

KEA agar üzerinde oluşan etrafı siyah zonlu enterokok kolonileri çift kademeli olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırmada ilk olarak enterokok kolonileri aseptik şartlar altında bir öze ile alınarak Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459) besiyerine aktararak 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sürme yöntemi ile Tryptic Soy Agar (CASO Agar) (Merck 1.05458) üzerine ekim yapılmış ve tek koloniler elde edilmiştir (Şekil 3.1). Tek koloniye düşürülen koloniler tekrar TSB’ye ekilerek inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.1. KEA üzerinde gelişen muhtemel enterokok kolonileri ve saflaştırma basamakları.

3.2.2 Enterokokların ön identifikasyonu

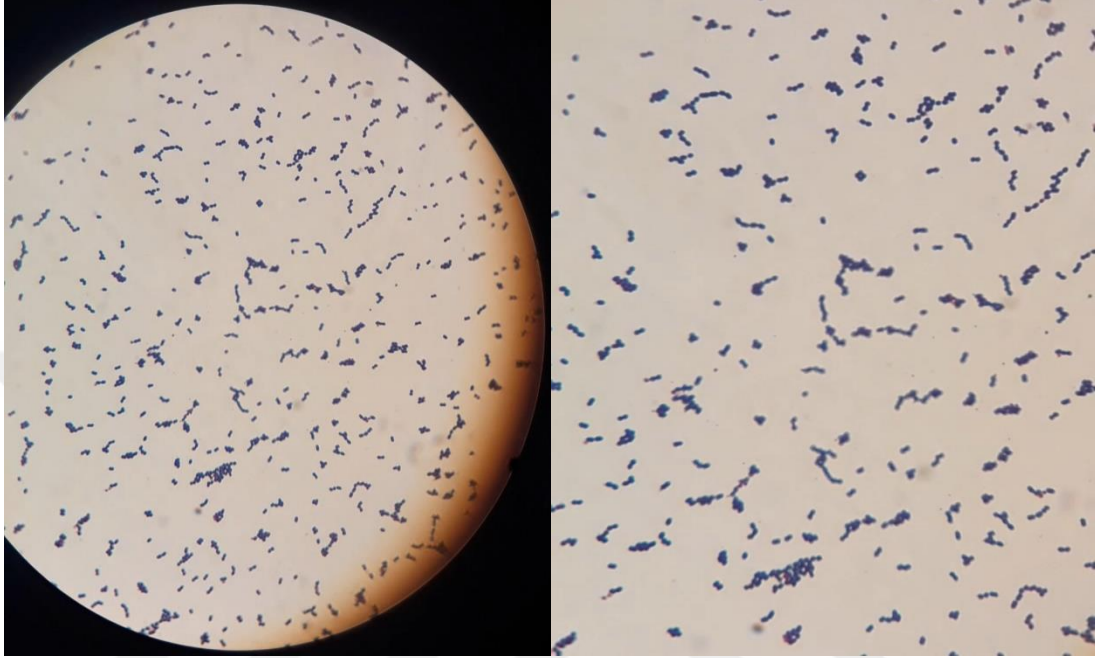
3.2.2.1 Katalaz testi

Çift kademeli saflaştırma sonucunda TSB besiyerinde gelişen 18-24 saatlik aktif kültürlerden bir öze dolusu alınarak temiz bir lam üzerine alınıp % 3'lük H_2O_2 çözeltisi damlatılmıştır. Bu işlemin sonucunda, gaz çıkışı gözlenmeyen koloniler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Whittenburry, 1964).

3.2.2.2 Gram boyama

Gram reaksiyonu Norris vd., (1981) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. TSB besiyerlerinde gelişen 18-24 saatlik aktif kültürler Gram boyamaya tabi tutulmuştur. Kültürler lam üzerine, distile su ile yayılarak, preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, ateşte fikse edildikten sonra, kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Havada kurutulduktan sonra, iyot çözeltisi ile 1 dakika muamele edilen preparatlar, distile su ile yıkanıp, tekrar havada kurutulmuştur. Daha sonra alkol (%95) ile 15 saniye muamele edilip en son safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır. Gram

boyama sonucunda menekşe moru olarak gözlemlenen kok, diplokok veya tetrakok yapıdaki kültürler saflık kontrolleri yapıldıktan sonra ayrılmıştır (Aydın, 2017; Özteber, 2013). Şekil 3.2’ de Gram boyaması yapılan suşların mikroskop altındaki görünümü verilmiştir.



Şekil 3.2. Saflaştırılmış izolatların gram reaksiyonlarının mikroskoptaki görüntüsü.

3.2.3 Saf kültürlerin muhafazası

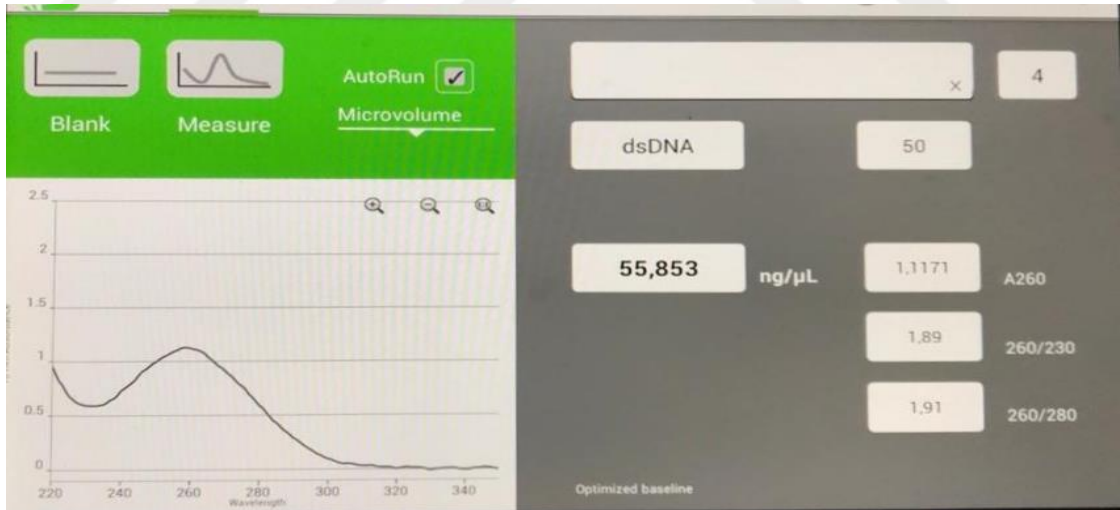
Ön tanımlama sonucu Gram-pozitif ve katalaz-negatif saflık kontrolleri yapıldıktan sonra %40 oranında steril gliserol içeren TSB besiyerinde -24 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4 *Enterococcus* suşlarının PZR yöntemi ile tanımlanması

3.2.4.1 DNA izolasyonu

İzolatların toplam genomik DNA’ları Promega Wizard Genomik DNA izolasyon kiti (Promega, USA) kullanılarak izole edilmiştir. Bu bağlamda, ön tanısı yukarıda anlatıldığı gibi yapılan ve -24 °C’de muhafaza edilen enterokok suşları aktifleştirilmiştir. 18-24 saat sonra her bir izolat 1.5 mL’lik eppendorf tüplerine aktarılmış olup 14.000 rpm’de 2 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant atılmıştır. Pellet 480 µL, 50mM konsantrasyonundaki EDTA

solüsyonu içinde iyice süspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre duvarını zayıflatmak amacıyla 120 µL lizozim enzimi eklenmiş ve 37 °C’de bir saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, 14.000 rpm’de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücre duvarını iyice yıkmak amacıyla 600 µL Nuclei Lysis solüsyonu eklenmiş ve iyice vortekslenerek 80 °C’de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra, 3 µL RNase solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve 37 °C’de 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra 200 µL protein çöktürme solüsyonu eklenmiştir ve buz küplerinin içinde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra, 14.000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilerek genomik DNA’yı içeren süpernatant başka bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 600 µL isopropanol eklenerek 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kuruduktan sonra %70’lik ethanol ile yıkanmıştır. Son olarak, DNA’ların konsantrasyonları NanoDrop ND-2000 spektrofotometre (Thermo Scientific, USA) kullanılarak yaklaşık 50 ng konsantrasyonlarına seyreltilmiş (Şekil 3.3) ve kullanılabilecek kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. P₁E₁ numaralı izolatin spektrofotometrik DNA grafiği.

3.2.4.2 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu

PZR amplifikasyonu için hedef bölge olarak 16S rRNA bölgesi seçilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ileri ve geri primer olarak sırasıyla 5'-GAG AGT TTG ATY CTG GCT CAG-3' (Amp-F) ve 5'- AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3' (Amp-R) (Y

= C/T; R = A/G) kullanılmıştır (Baker vd., 2003). *Enterococcus* suşlarında 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu PZR karışımları kullanılarak T100 termal döngü cihazında (Bio-Rad, USA) yapılmıştır. PZR tüplerine toplam hacim 50 µL olacak şekilde PZR karışımları eklenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı.

Madde Adı	Miktar
Genomik DNA	1 µL
5x PZR tamponu	10 µL
dNTP	0.4 µL
İleri primer FP (20mM)	1 µL
Geri primer RP (20mM)	1 µL
5 U Taq DNA polimeraz enzimi	0.25 µL
ddH ₂ O	36.35 µL
Toplam Hacim	50 µL

Tüm bileşenler 1 µL Genomik DNA, 10 µL 5 × PZR tamponu, 0.4 µL dNTP, 1 µL 20 mM primer FP ve RP, 0.25 µL 5 U Taq polimeraz ve steril ddH₂O iyice karıştırıldıktan sonra PZR termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. PZR denemelerinde; 95 °C’de 120 saniye (başlangıç denatürasyonu) 1 döngü, 95 °C’de 30 saniye (çift zincirin açılması), 55 °C’de 20 saniye (primerlerin bağlanması), 72 °C’de 30 saniye (zincir uzaması) olarak programlanmıştır ve bu işlemler 20 defa tekrarlanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzama aşaması için 72 °C’de 5 dakika (1 döngü) eklenmiştir ve 4 °C’ye soğutulmuştur. Çizelge 3.2’de PZR amplifikasyon aşamaları verilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR amplifikasyonu için oluşturulan PZR şartları.

Başlangıç denatürasyon	95 °C 2 dakika (1 döngü)
Denatürasyon	95 °C 30 saniye (20 döngü)
Bağlanma	55 °C 20 saniye (20 döngü)
Uzama	72 °C 30 saniye (20 döngü)
Son uzama	72 °C 5 dk (1 döngü)
Bekleme	4 °C (∞)

3.2.4.3 PZR’da çoğaltılan DNA örneklerinin jel elektroforezinde kontrolü ve dizi analizi

PZR ürünlerinin elektroforezi %1.2’lik agaroz içeren jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemi için yatay jel sistemleri kullanılmıştır. %1.2’lik oranda tartılan

Agaroza 100 Ml 1x Tris-Asetat (TAE) (Tris 4.84 g, Sodyum asetat 4.08 g, EDTA 0.37 g, Destile su 1000 mL, pH 8.0±0.02) elektroforez tamponu eklenmiştir ve mikrodalga fırın içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen ortam 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş ve elektroforez plakalarına dökülmüştür. Jel tarakları yerleştirilerek 40-45 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 1x TAE tampon solüsyonu jelin üzerini tamamen kapatacak şekilde elektroforez tankına ilave edilerek, jel tarakları jele zarar vermeden çıkarılmıştır. Amplifikasyon DNA ürünlerinden 10 µL alınarak, temiz bir parafilm üzerinde 2 µL marker boya çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karıştırılan ürün mikropipet yardımıyla agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmıştır ve 90 volt elektirik akımı altında 60 dakika elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, ortamdan alınan jel yaklaşık 15-20 dakika ethidium bromide içeren solüsyonda bekletilerek boyanması sağlanmıştır. Jel bir G:BOX F3 jel görüntüleme sistemi (Cambridge, İngiltere: Syngene) yardımı ile fotoğraflanarak ürünlerin varlığı teyit edilmiştir.

Elektroforez sonucu bantların varlığı anlaşılan ürünlerin geri kalan 20 µL'si ABI Prism® 3730xi cihazı yardımı ile sekans bilgilerinin elde edilmesi amacı ile ticari bir şirkete gönderilmiştir (Macrogen, Güney Kore). Sekanslama işlemi çift yönlü yapılmıştır.

3.2.4.4 Verilerin işlenmesi ve filogenetik analizler

Sekanslama sonunda elde edilen veriler MEGA X bilgisayar programı ile analiz edilmiştir. Bu amaçla veriler (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) adlı internet sitesi kullanılarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank veritabanı kütüphanesine kayıtlı referans izolatlarla BLAST analizi vasıtasıyla kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda, referans izolatlar ile benzerlik gösteren izolatlar NCBI sistemine tanımlanmıştır.

Ek olarak, izolatlara ait sekanslar ile GenBank veri tabanından elde edilen referans sekanslar (*E. faecalis*: NR114782, NR115765, NR040789; *E. faecium*: NR042054, NR114742, NR113904; *E. durans*: NR113257, NR036922) analizlere ilave edilmiştir (Thompson vd., 1994).

Filogenetik analizler, 16S rRNA bölgesinin sekans verilerine dayandırılarak MEGA X yazılımında Maximum-Likelihood yöntemi kullanılarak 1000 tekrarlı bootstrap testi ile gerçekleştirilmiştir (Kumar vd., 2018; Ayhan vd., 2020).

3.2.5 *Enterococcus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin saptanması

Enterokok suşlarının antibiyotik dirençlilik/duyarlılıklarının belirlenmesinde Bauer vd. (1966) tarafından önerilen antibiyotik disk difüzyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. *Enterococcus* suşları 37 °C’de 18-24 saat boyunca TSB besiyerlerinde aktifleştirilerek 0.1 mL bakteri kültürü alınarak Muller Hinton Agar (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyerine yayma kültür ekim yöntemi ile yayılmıştır. Sonrasında besiyeri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Petri kutuları 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları kumpas yardımıyla ölçülmüştür (Cariolato vd., 2008).

Enterococcus suşlarının antibiyotik duyarlılık düzeyleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI) (CLSI, 2011; 2016) tarafından belirlenen kriterler çerçevesinde; dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *Enterococcus* türleri için antibiyotik duyarlılık sınırları.

Antibiyotikler	Disk içeriği	Zon çapı yaklaşık (mm)		
		R	I	S
Penisilin	10 µg	≤14	-	≥15
Vankomisin	30 µg	≤14	15-16	≥17
Teikoplanin	30 µg	≤10	11-13	≥14
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Streptomisin	10 µg	≤11	12-13	≥14
Tetrasiklin	30 µg	≤14	15-18	≥19
Ampisilin	10 µg	≤16	-	≥17
Rifampin	5 µg	≤16	17-19	≥20
Siprofloksasin	5 µg	≤15	16-20	≥21
Eritromisin	15 µg	≤13	14-22	≥23
Gentamisin	120 µg	≤12	13-14	≥15
Nalidiksik asid	30 µg	≤13	14-18	≥19
Norfloksasin	10 µg	≤12	13-16	≥17

R*: dirençli **I:** orta duyarlı **S:** duyarlı

Antibiyotikleri içeren diskler; ampisilin (10 µg), penisilin (10 µg), teikoplanin (30 µg), vankomisin (30 µg), gentamisin (120 µg), streptomisin (10 µg), siprofloksasin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), tetrasiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), nalidiksik asit (30 µg), norfloksasin (10 µg), oksasilin (1 µg), ve rifampisin (5 µg).ticari bir kurumdan (Bioanalyses, Türkiye) temin edilmiştir.

Enterokoklar kazanmış oldukları antibiyotik direncini bir bakteriden diğerine aktarabilmektedir dolayısıyla enterokoklar birlikte yaşadığı mikrofloranın diğer üyelerini de etkileyerek bu bakterilerin de antibiyotiklere direnç kazanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle gıda kaynaklı enterokokların hastalarda oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere direnç göstermesi büyük bir sorundur. Yukarıda bahsedilen antibiyotiklerin bazen tek bazen de kombine şeklinde infeksiyonların tedavi edilmesinde kullanılması, ayrıca ampisilin, vankomisin ve gentamisinin çoklu antibiyotiğe dirençli enterokokların tedavi edilmesinde en yaygın kullanılan antibiyotikler arasında yer alması çalışmamızda kullanılan bu antibiyotiklerin seçilmesine olanak sağlamıştır.

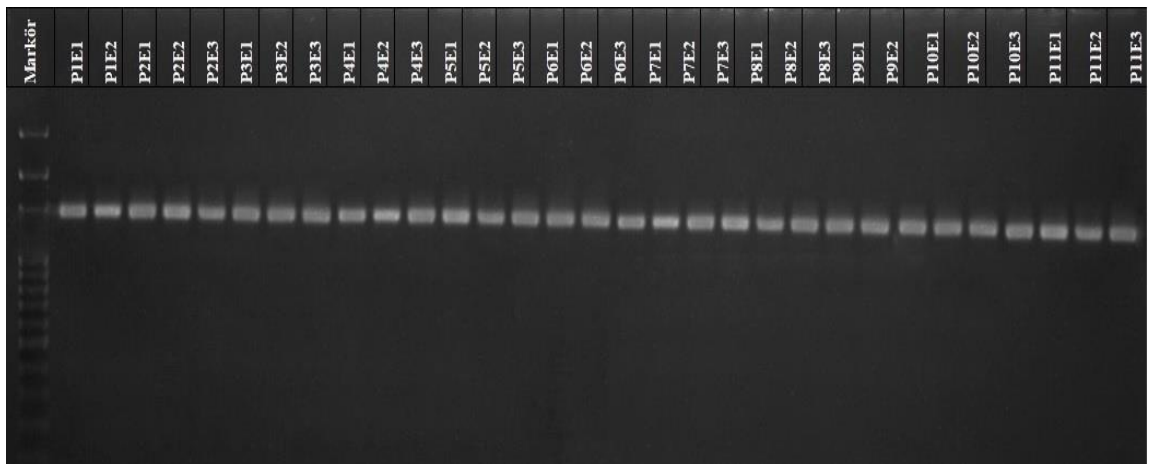
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Enterococcus* Suşlarının İzolasyon Sonuçları

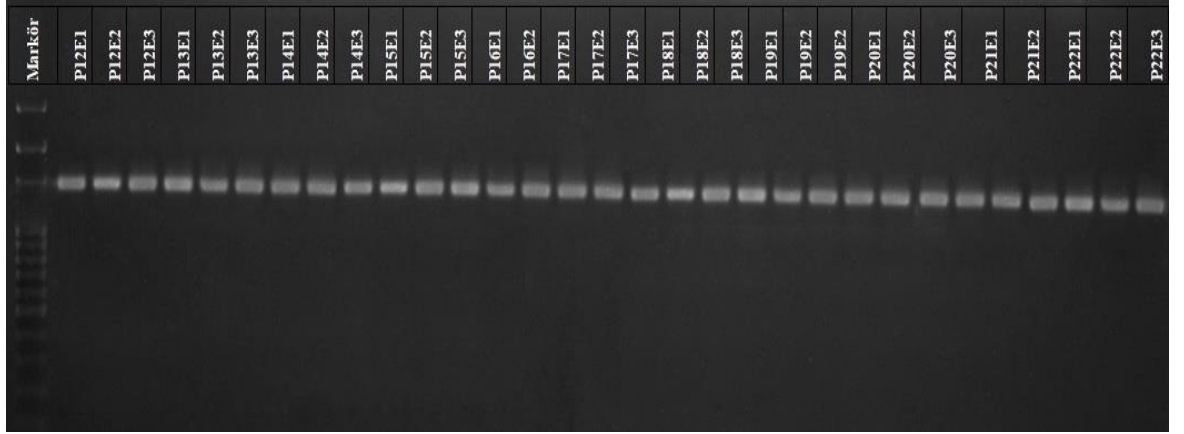
Bu çalışma kapsamında, Aksaray ilinde satışa sunulan geleneksel yollarla üretilmiş tulum peyniri örneklerinin KEA agar ortamında geliştirilen koyu kahverengi renkte ve çevrelerinde berrak zon oluşumu gösteren 62 izolat muhtemel enterokok olarak izole edilmiştir. Seçilen izolatların tümü Gram-pozitif, kok morfolojisine sahip, katalaz-negatif rekasyon veren, *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmıştır. İzolatların numaralandırılması ise kullanılan peynirin numarası ve peynire ait izolatın sırası dikkate alınarak numaralandırılmıştır. Örneğin 5 numaralı peyirden izole edilen ve *Enterococcus* spp. olarak değerlendirilen üç numaralı izolat P₅E₃ şeklinde kodlanmıştır. Bu izolatlar -24 °C’de muhafaza edilmektedir.

4.2 *Enterococcus* Suşlarının PZR Yöntemi İle Çoğaltılan DNA Örneklerinin Agaroz Jelde Görüntüsü

Ön identifikasyonu yapılan ve cins bazında *Enterococcus* olarak belirlenen 62 izolatın tamamı 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. 16S rRNA yöntemi sonucu izolasyonu yapılan DNA örnekleri PZR’da çoğaltıldıktan sonra agaroz jelde görüntülenmiştir. Agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Enterococcus* spp. suşlarının genomik DNA örneklerinin (P₁E₁-P₁₁E₃) jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.2. *Enterococcus* spp. suşlarının genomik DNA örneklerinin (P₁₂E₁-P₂₂E₃) jel elektroforez görüntüsü.

Çoğaltılan 16S rRNA fragmentlerinin elektroforezi %1.2 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Agaroz jelde görüntülenen izolatların tamamının yaklaşık 1500 bp bölgesinde bant verdiği gözlenmiştir. Görüntülerden de anlaşılacağı gibi DNA izolasyon işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve DNA örnekleri görüntüleri rahatlıkla gözlenebilmektedir.

4.2.1 16S rRNA gen bölgesinin dizi analiz sonuçları

Çoğaltılan 16S rRNA bölgesinin sekanslanması sonucunda elde edilen veriler BLAST programı kullanılarak NCBI veritabanına kayıtlı dizi analizleri ile karşılaştırılmış ve bu izolatların %99-100 homoloji sergilediği tespit edilmiştir. Buna göre izolatlara ait bilgiler ve NCBI erişim numaraları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Enterokok türlerinin izolat kodu ve NCBI erişim numaraları.

İzolat kodu	NCBI veritabanına tanımlanan izolat adı	NCBI erişim numarası
P ₁ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC1	MT393685
P ₁ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 2	MT393686
P ₂ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 3	MT393687
P ₂ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 4	MT393688
P ₂ E ₃	<i>E. faecalis</i> ATC 5	MT393689
P ₃ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 6	MT393690
P ₃ E ₂	<i>E. durans</i> ATC 7	MT393691
P ₃ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 8	MT393692
P ₄ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 9	MT393693
P ₄ E ₂	<i>E. durans</i> ATC 10	MT393694
P ₄ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 11	MT393695
P ₅ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 12	MT393696
P ₅ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 13	MT393697
P ₅ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 14	MT393698
P ₆ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 15	MT393699
P ₆ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 16	MT393700
P ₆ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 17	MT393701
P ₇ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 18	MT393702
P ₇ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 19	MT393703
P ₇ E ₃	<i>E. durans</i> ATC 20	MT393704
P ₈ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 21	MT393705
P ₈ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 22	MT393706
P ₈ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 23	MT393707
P ₉ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 24	MT393708
P ₉ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 25	MT393709
P ₁₀ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 26	MT393710
P ₁₀ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 27	MT393711
P ₁₀ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 28	MT393712
P ₁₁ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 29	MT393713
P ₁₁ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 30	MT393714
P ₁₁ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 31	MT393715
P ₁₂ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 32	MT393716
P ₁₂ E ₂	<i>E. durans</i> ATC 33	MT393717
P ₁₂ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 34	MT393718
P ₁₃ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 35	MT393719
P ₁₃ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 36	MT393720
P ₁₃ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 37	MT393721
P ₁₄ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 38	MT393722
P ₁₄ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 39	MT393723
P ₁₄ E ₃	<i>E. faecalis</i> ATC 40	MT393724
P ₁₅ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 41	MT393725
P ₁₅ E ₂	<i>E. durans</i> ATC 42	MT393726
P ₁₅ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 43	MT393727
P ₁₆ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 44	MT393728

Çizelge 4.1 (devam). Enterokok türlerinin izolat kodu ve NCBI erişim numaraları.

İzolat kodu	NCBI veritabanına tanımlanan izolat adı	NCBI erişim numarası
P ₁₆ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 45	MT393729
P ₁₇ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 46	MT393730
P ₁₇ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 47	MT393731
P ₁₇ E ₃	<i>E. faecalis</i> ATC 48	MT393732
P ₁₈ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 49	MT393733
P ₁₈ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 50	MT393734
P ₁₈ E ₃	<i>E. faecalis</i> ATC 51	MT393735
P ₁₉ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 52	MT393736
P ₁₉ E ₂	<i>E. faecalis</i> ATC 53	MT393737
P ₁₉ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 54	MT393738
P ₂₀ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 55	MT393739
P ₂₀ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 56	MT393740
P ₂₀ E ₃	<i>E. faecium</i> ATC 57	MT393741
P ₂₁ E ₁	<i>E. faecalis</i> ATC 58	MT393742
P ₂₁ E ₂	<i>E. faecium</i> ATC 59	MT393743
P ₂₂ E ₁	<i>E. faecium</i> ATC 60	MT393744
P ₂₂ E ₂	<i>E. durans</i> ATC 61	MT393745
P ₂₂ E ₃	<i>E. durans</i> ATC 62	MT393746

16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi ile tanımlaması yapılan 62 izolatın, 30'u *E. faecium* (%48.39), 25'i *E. faecalis* (%40.32) ve 7 adedi de *E. durans* (%11.29) olarak tanımlanmıştır. İzolatların yüzdesel dağılımları ile ilgili detaylı bilgiler Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından yapılan Türk peynirlerinde *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*'ın en sık izole edilen türler arasında olduğu rapor edilmiştir (Aydın ve Ardıç, 2019; Bulut vd., 2005; Dağdemir ve Özdemir, 2008; İspirli vd., 2017).

Çizelge 4.2. *Enterococcus* spp. suşlarının tür düzeyinde dağılımı.

Gıda örneği	Adet	Suşlar	Sayı	İzolat Kodu	%
Tulum peyniri	22	<i>E. faecium</i>	30	ATC1, ATC2, ATC3, ATC6, ATC8, ATC11, ATC14, ATC16, ATC17, ATC23, ATC25, ATC28, ATC31, ATC32, ATC34, ATC36, ATC37, ATC41, ATC43, ATC44, ATC45, ATC49, ATC50, ATC52, ATC54, ATC55, ATC56, ATC57, ATC59, ATC60	48.39
		<i>E. faecalis</i>	25	ATC4, ATC5, ATC9, ATC12, ATC13, ATC15, ATC18, ATC19, ATC21, ATC22, ATC24, ATC26, ATC27, ATC29, ATC30, ATC35, ATC38, ATC39, ATC40, ATC46, ATC47, ATC48, ATC51, ATC53, ATC58	40.32
		<i>E. durans</i>	7	ATC7, ATC10, ATC20, ATC33, ATC42, ATC61, ATC62	11.29

Enterokoklar sağlıklı insanların ve hayvanların sindirim sisteminde baskın mikrofloranın doğal üyeleri olup, olumsuz çevre koşullarında bile yaygın olarak bulunan bakterilerdir. İnsan dışkılarından sıklıkla izole edilen *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* türlerinin çiftlik hayvanlarında daha az sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir. İnsan dışkılarından en çok *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri izole edilirken, sığır, koyun ve tavuk gibi çiftlik hayvanlarında ise en çok *E. faecium*, *E. cecorum*, *E. faecalis* izole edildiği bunun dışında *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium* ve *E. gallinarum* türlerine daha az sıklıkla rastlanıldığı belirtilmiştir (Çetinkaya ve Muş, 2010; Toğay ve Temiz, 2011).

El-Din vd. (2002), yaptıkları çalışmada çiğ sütteki baskın mikrofloranın *E. faecium* türü olduğunu bildirmişlerdir. Bu bakterilerin peynirlerdeki varlığını yüksek sıcaklık, tuz ve asite olan toleranslarından kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir.

Enterokokların peynir mikroflorasındaki varlığı, pastörizasyon sıcaklıklarına dayanabilmesi, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarındaki gelişiminin bir göstergesidir. Peynirlerde yüksek sıklıkla izole edilen enterokok türleri *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*'dır.

Ayrıca enterokoklar peynirde olgunlaşma aşamasında her ne kadar tat ve aromaya katkı sağlasada, hayvansal gıdalar başta olmak üzere ısıtıl işlem görmüş ve çiğ süttten üretilen taze peynirlerde, sağım veya üretim sırasında alet ekipmanlardan indirekt olarak fekal kaynaklı bir bulaşı olduğunun göstergesidir. (Çelikyurt, 2008; Toğay ve Temiz, 2011).

Yoğurtçu (2011)'nın tulum peynirleri üzerine yaptığı çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığını araştırmış ve enterokok türlerini 16S rRNA dizi analiz yöntemi kullanılarak tanımlamıştır. Peynirlerden izole ettiği 47 enterokok suşunun 21'ini *E. faecium*, 14'ünü *E. durans*, 12'sini ise *E. faecalis* olarak tanımlamıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikrofloranın *E. faecium* olması ve diğer tanımlanan türler bakımından benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Tuncer (2009)'in tulum peynirleri üzerine yaptığı çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığını araştırmıştır. Peynirlerden izole ettiği 39 enterokok suşunun 17'sini *E. faecium* (%43.58), 11'ini *E. faecalis* (%28.21) ve 11'ini ise *E. durans* (%28.21) olarak tanımlamıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikrofloranın *E. faecium* olması ve diğer tanımlanan türler bakımından benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Şentürk (2017)'ün 24 adet tulum peyniri üzerine yaptığı çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığını araştırmış ve enterokok türlerini 16S rRNA dizi analiz yöntemi kullanılarak tanımlamıştır. Peynir örneklerinden izole ettiği 8 adet enterokok suşunun 4'ü *E. faecium* ve 4'ü *E. faecalis* olarak tanımlamıştır.

Bir diğer çalışmada ise Cosentino vd. (2004) geleneksel peynirler üzerine yaptıkları çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Peynirlerden izole edilen 118 enterokok suşunun 84'ünü *E. faecium* (%71.19), 24'ünü *E. durans* (%20.34) ve 10'unu ise *E. faecalis* (%8.47) olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik göstermektedir.

Jurkovic vd. (2006) yaptıkları çalışmada yöresel peynirlerde *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmış ve enterokok türleri moleküler yöntem kullanılarak tanımlanmıştır. Peynir örneklerinden izole edilen 308 enterokok suşunun baskın mikrofloranın 177'sini *E. faecium* (%57.47), 59'unu *E. durans* (%19.15), 41'ini *E. faecalis* (%13.31) türlerinin oluşturduğunu baskın olmayan mikrofloranın 13'ünü *E. mundtii* (%4.22) ve 11'ini *E. casseflavus* (%3.57) türlerinin oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflorann *E. faecium* olması bakımından benzerlik gösterirken, diğer baskın olmayan türlerin tanımlanması bakımından farklılık göstermektedir.

Gökovalı (1980)'nın teneke tulum peyniri üzerine yaptığı çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Peynirlerden izole ettiği 128 enterokok suşunun 74'ünü *E. durans* (%57.81), 31'ini *E. faecium* (%24.22), 16'sını *E. faecalis* (%12.5) ve 7'si *E. faecalis* ssp. *Liquefaciens* (%5.47) olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik gösterirken, tez sonucunda *E. faecalis* ssp. *Liquefaciens* türüne hiç rastlanılmamıştır.

Morandi vd. (2006) yaptıkları çalışmada peynir örneklerinde *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Peynirlerden izole edilen 68 enterokok suşunun 35'ini *E. faecalis*, 27'sini *E. faecium* ve 6'sını *E. durans* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikrofloranın *E. faecalis* olması bakımından farklılık gösterirken, diğer tanımlanan türler bakımından benzerlik göstermektedir.

Çelikyurt (2008)'un yaptığı çalışmada Sürk peynirleri örneklerinden 46 LAB izole edilmiştir. 16S rRNA dizi analiz sonucuna göre 6 tanesi *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmış ve 5'ini *E. durans* (%10.86) ve 1'ini *E. faecium* (%2.17) olarak tespit etmiştir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından farklılık göstermektedir.

Kanak vd. (2018) Sakarya'da geleneksel olarak üretilen 3 adet peynir örneklerinde LAB varlığı araştırılmış ve MALDI-TOF-MS yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Peynir örneklerinden 15 LAB izole edilmiş 5'ini *E. faecalis* ve 3'ünü *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında *E. durans* türünün tanımlanmaması bakımından farklılık göstermektedir.

Kırmacı (2010)'nın geleneksel Urfa peynirleri üzerine yaptığı çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığını araştırmış ve enterokok türlerini 16S rRNA dizi analiz yöntemi kullanılarak tanımlamıştır. Peynirlerden izole edilen 70 enterokok suşunun 28'ini *E. faecium* (%40), 23'ünü *E. durans* (%32.85), 13'ünü *E. faecalis* (%18.57), 4'ünü *E. lactis* (%5.71) ve 2'sini *E. hirae* (%2.85) olarak tanımlamıştır. Sonuçları tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik gösterirken, *E. lactis* ve *E. hirae* türlerinin tanımlanması bakımından farklılık göstermektedir.

Çıtak vd. (2004) yaptıkları çalışmada 30 beyaz peynir örneklerinde *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Peynirlerden izole edilen 101 enterokok suşunun 62'sini *E. faecalis* (%61.3) ve 25'ini *E. faecium* (%24.7) türlerinin baskın mikroflorayı oluşturduğunu ve baskın olmayan mikrofloranın 7'sini *E. durans* (%6.9), 5'ini *E. mundtii* (%4.9) ve 2'sini ise *E. hirae/dispar* (%1.9) türlerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında hem baskın mikroflora bakımından hem de baskın olmayan *E. mundtii* ve *E. hirae* türlerinin tanımlanması bakımından farklılık göstermektedir.

Yerlikaya (2012), tarafından yapılan çalışmada geleneksel süt ürünlerinden izole edilen 167 enterokok suşunun 122'sini *E. faecium* (%73.05), 18'sini *E. durans* (%10.78), 17'sini *E. faecalis* (%10.18), 8'ini *E. faecalis* var. (%4.79) ve 2'sini *E. hirae* (%1.19) olarak tanımlamıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik gösterirken, *E. faecalis* var ve *E. hirae* türlerinin tanımlanması bakımından farklılık göstermektedir.

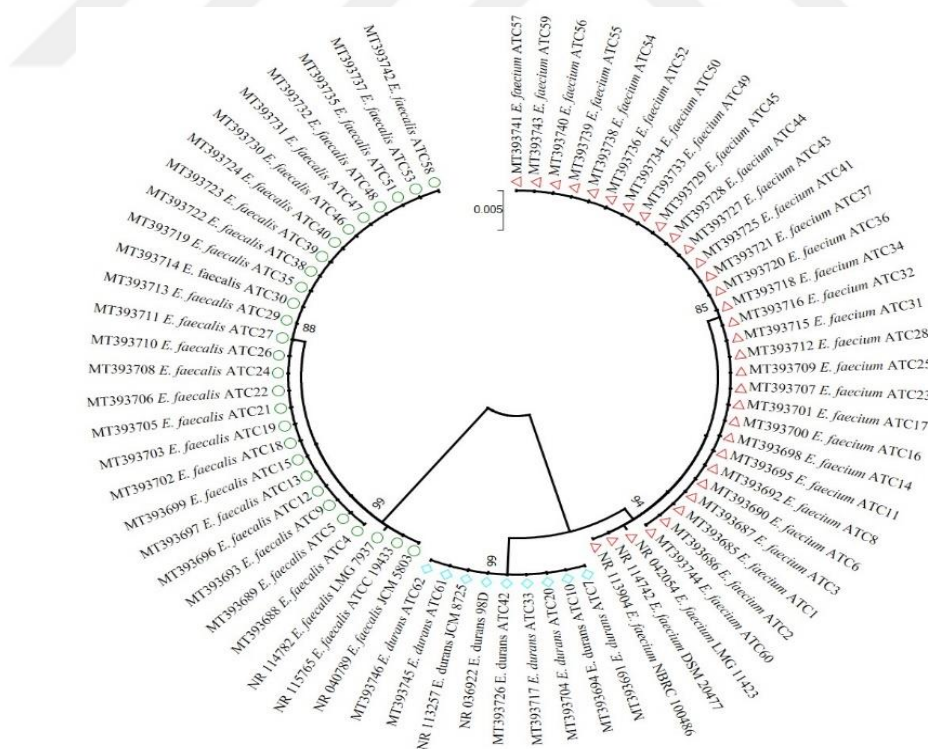
Durlu-Özkaya (2001), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı beyaz peynir örneklerinden 85 LAB izole etmiş ve 54'ünü *Enterococcus* spp. olarak tanımlamıştır. Enterokok suşunun 29'unu *E. faecium*, 18'ini *E. durans* ve 7'sini *E. faecalis* olarak tanımlamıştır. Sonuçları tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikrofloranın *E. faecium* olması bakımından benzerlik göstermektedir.

İspirli (2016)'nin Erzurum tulum peyniri üzerine yaptıkları çalışmada *Enterococcus* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmış ve 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Enterokok türlerinden *E. faecium* (%61.61), *E. faecalis* (%19.64), *E. italicus* (%8.03), *E. thailandicus* (%5.36), *E. hirae* (%3.57) ve *E. mundtii* (%1.78) tanımlanmıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik gösterirken, *E. italicus*, *E. thailandicus*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerinin tanımlanması bakımından farklılık göstermektedir.

Bulut (2003)'ün çömlek peyniri üzerine yaptığı çalışmada 113 LAB izole etmiş ve 59'unu *Enterococcus* cinsi olarak tanımlamıştır. Enterokok suşunun 30'unu *E. faecium* (%50.85), 8'ini *E. faecalis* (%13.56), 3'ünü *E. avium* (%5.08), 2'sini *E. durans* (%3.39) ve 16'sını *Enterococcus* spp. (%27.11) olarak tanımlanmıştır.

Peynir örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının farklılık göstermesinin en büyük nedeni çiğ sütün mikrobiyal yükü ve farklılığı, coğrafi farklılıklar ve sütün çeşididir. Ayrıca bunun yanı sıra 16S rRNA dizi analizi ve farklı tanımlama yöntemlerinin kullanılması da türlerin farklı olmasından ileri gelmektedir.

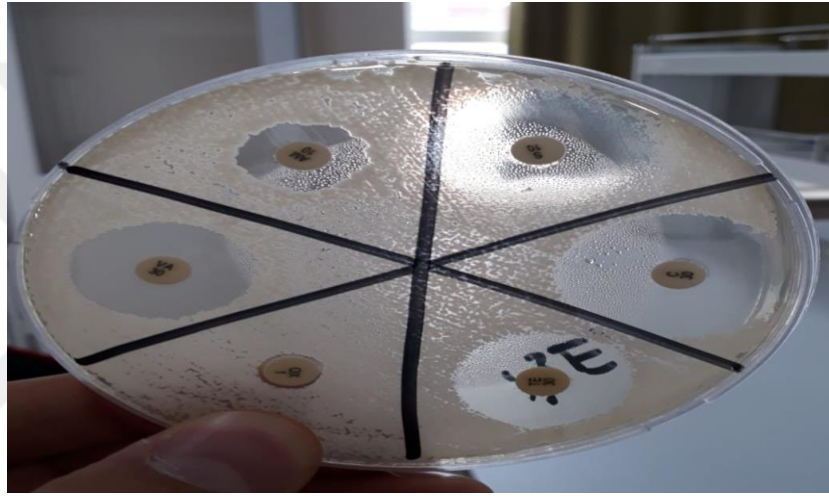
Türler arasındaki poliformizmi ortaya çıkaran maksimum olasılık yöntemiyle 16S rRNA'nın filogenetik analizi bootstrap testinde, bir arada kümelenen ilişkili taksonların dallarında bitişik olarak çoğaltılmış ağaçların yüzdesi Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Filogenetik ağaç, 70 izolat (çalışmadan elde edilen izolatlar ile gen bankasından elde edilen referans suşlar) iki ana kümeye ayrılmıştır. *E. faecalis* suşları, *E. durans* ve *E. faecium* suşlarına göre daha fazla benzer homoloji sergilemiştir.



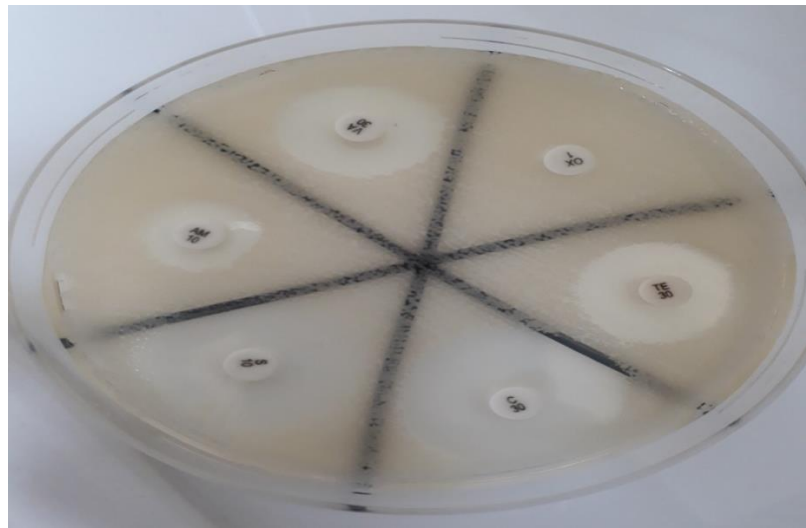
37

4.3 *Enterococcus* Türlerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

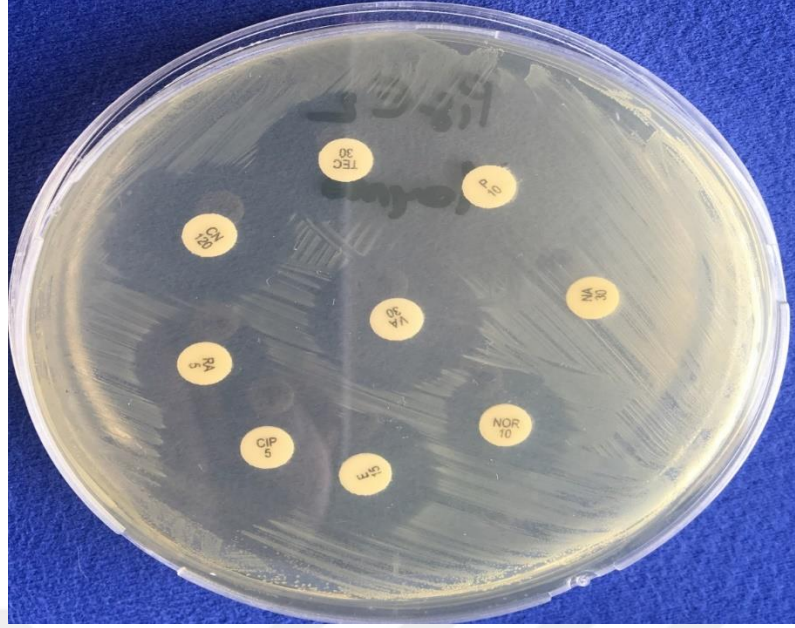
Araştırma kapsamında *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* türlerine ait 62 izolat, 14 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Antibiyotik testleri sonucunda enterokok suşlarının tamamı norfloksasin asite (%100) duyarlı bulunurken, ampisilin (%92), penisilin (%93.3), teikoplanin (%85.3), kloramfenikol (%79.7), siprofloksasin (%77.3), vankomisin (%70.7), tetrasiklin (%70.6) ve eritromisin (%61.2) antibiyotiklerine ise orta ve yüksek düzeyde duyarlı oldukları belirlenmiştir. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da *Enterococcus* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *Enterococcus durans* P₂₂E₃ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.



Şekil 4.5. *Enterococcus faecalis* P₉E₁ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.



Şekil 4.6. *Enterococcus faecium* P₁₈E₂ suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları.

Çalışma sonucunda enterokok suşları, diğer antibiyotiklerden nalidiksik asite (%100), oksasiline (%92) ve streptomisine (%72.6) farklı düzeylerde dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca tulum peynirlerinden izole edilen *Enterococcus* spp. arasından *E. faecalis* suşları, *E. durans* ve *E. faecium* suşlarına göre antibiyotiklere karşı dirençli fenotipleri olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* suşları; nalidiksik asite (%100), streptomisine (%60), oksasiline (%96), tetrasikline (%56), vankomisine (%80) ve rifampine (%76), *E. faecium* suşları; nalidiksik asite (%100), oksasiline (%83.5) ve streptomisine (%76.9) ve *E. durans* suşları; nalidiksik asite (%100), oksasiline (%100), streptomisine (%85.7) ve gentamisine (%57.1) orta ve yüksek seviyede dirençli oldukları belirlenmiştir. Çizelge 4.3’de *Enterococcus* suşlarının antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri.

Antibiyotikler	<i>E. faecalis</i> (n=25)			<i>E. faecium</i> (n=30)			<i>E. durans</i> (n=7)			Toplam (n=62)		
	S*	I*	R*	S*	I*	R*	S*	I*	R*	S*	I*	R*
Ampisilin	80	-	20	100	-	-	100	-	-	92	-	8
Penisilin	100	-	-	86.6	6.7	6.7	85.7	-	14.3	93.3	2.7	4
Teikoplanin	84	16	-	76.8	6.7	16.5	100	-	-	85.3	8	6.7
Vankomisin	20	24	56	90	3.3	6.7	100	-	-	70.7	9.3	20
Gentamisin	36	56	8	50.5	36.3	13.2	42.9	57.1	-	53.3	38.7	8
Streptomisin	40	28	32	23.1	53.8	23.1	14.3	28.6	57.1	27.4	40.3	32.3
Siprofloksasin	80	12	8	63.7	23.1	13.2	57	14.3	28.7	77.3	12	10.7
Kloramfenikol	68	8	24	73.5	16.5	10	100	-	-	79.7	9.3	12
Tetrasiklin	44	24	32	76.8	16.5	6.7	85.7	14.3	-	70.6	18.7	10.7
Eritromisin	52	20	28	67	19.8	13.2	71.3	14.3	14.3	61.2	19.4	19.4
Nalidiksik asit	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Norfloksasin	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Oksasilin	4	4	92	16.5	3.3	80.2	-	28.7	71.3	8	5.3	86.7
Rifampin	24	12	64	59.4	13.2	27.4	57	14.3	28.7	54.6	10.7	34.7

Yoğurtçu ve Tuncer (2013), tulum peynirinden izole edilen 47 *Enterococcus* suşu eritromisine (%72.3), streptomisine (%55.3) ve tetrasikline (%34) yüksek düzeyde direnç gösterirken, ampisiline, kloramfenikole, gentamisine, penisiline, sülfametoksazol ve vankomisine tamamen duyarlı bulunmuştur. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında enterokok suşlarının streptomisine karşı göstermiş olduğu direnç ve diğer antibiyotiklere (ampisilin, gentamisin, kloramfenikol, vakomisin ve penisilin) duyarlı olması bakımından benzerlik göstermektedir.

Bulajić ve Mijačević (2004), farklı yöntemler kullanarak ürettikleri peynir örneklerinden izole edilen 42 adet enterokok izolatları disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotiklere karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. Enterokok izolatlarının penisiline (%65.82), tetrasikline (%62.02), linkomisine (%68.35), gentamisine (%27.84), neomisine (%31.64), eritromisine (%31.64) ve kloramfenikole (%65.82) karşı dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında enterokok türleri penisiline, gentamisine ve tetrasikline karşı göstermiş oldukları direnç bakımından farklılık gösterirken, enterokok türlerinin linkomisine ve neomisine karşı dirençlilikleri araştırılmamıştır.

Tatlı (2009)'nın yapmış olduğu 10 tulum peynir örneğinden 18 LAB izole edilmiş ve 10 tanesi vankomisine (%58), 6 tanesi siprofloksasine (%37), 5 tanesi gentamisine

(%26), 2 tanesi eritromisin (%11) ve 1 tanesi ise tetrasikline (%5) direnç gösterirken, izolatların %28'nin antibiyotiğe duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Tatlı (2009)'nın bir diğer çalışmasında, 15 adet beyaz peynir örneğinden izole ettiği 23 LAB izolatlarından 12'si vankomisine (%53), 7'si siprofloksasine (%31), 5'i gentamisine (%21), 3'ü eritromisine (%12), 1'i kloramfenikole (%3) ve 1'i rifampine (%3) karşı dirençli oldukları bildirilmiştir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında antibiyotiklere direnç göstermesi bakımından farklılık göstermektedir.

Çıtak vd. (2004) yaptıkları çalışmada, 30 beyaz peynir örneğinden 101 adet enterokok suşunun 13 adet antibiyotiğe farklı düzeylerde dirençli oldukları tespit edilmiştir. Enterokok suşlarının eritromisine (%93), streptomisine (%89.1), vankomisine (%86.1), oksasiline (%88.1) ve kloramfenikole (%79.2) karşı yüksek seviyede dirençli oldukları saptanmıştır. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında oksasilin ve streptomisine karşı dirençlilikleri benzerlik gösterirken, tez sonuçlarında eritromisin, vankomisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı bulunan direnç bakımından farklılık göstermektedir.

Tez çalışması sonucunda tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direnç özellik gösterdiği ve bu oranın %41.93 olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların 3 ve 6 arasında değişen sayıda antibiyotiğe karşı çoklu direnç özelliği Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Cariolato vd. (2008) yaptıkları çalışmada, süt ve süt ürünlerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline (%30.8) ve streptomisine (%25.6) karşı orta ve yüksek seviyede direnç gösterdikleri belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının 2 ile 4 arasında değişen sayıda antibiyotiklere %13.6 oranında çoklu antibiyotik direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında enterokok suşlarının tetrasikline göstermiş oldukları direnç bakımından farklılık göstermektedir.

Yoğurtçu (2011)'nin yaptığı çalışmada, tulum peynir örneklerinden izole edilen 47 enterokok suşunun antibiyotiğe karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. Enterokok suşlarından %48.9'u streptomisine ve %23.4'ü tetrasikline dirençli olarak belirlenmiştir. Çalışmada antibiyotiğe karşı dirençlilikleri belirlenen enterokok türlerinin %19.1'i çoklu antibiyotik direnç özelliği göstermiştir. Bu suşlardan 8 tane

E. faecalis 2 antibiyotiğe streptomisine ve tetrasikline direnç gösterirken, 1 adet *E. faecium* suşu da antibiyotiklere çoklu direnç özellik gösterdiği bildirilmiştir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında enterokok suşlarının streptomisine direnç göstermesi bakımından benzerlik gösterirken, tetrasikline direnç göstermesi bakımından farklılık göstermektedir.

Sievers vd. (1993) yaptıkları çalışmada, peynir örneklerinden *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarını izole etmişlerdir. Bu suşlar penisilin, sefalotin, furadoin, fusidin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotikleri içerisinde bir ya da daha fazla sayıda antibiyotiğe karşı dirençlilik gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında eritromisine, tetrasikline ve kloramfenikole dirençlilikleri bakımından farklılık gösterirken çalışmamızda enterokok suşlarının sefalotin, furadoin ve fusidin antibiyotiklere karşı dirençlilikleri araştırılmamıştır.

Çizelge 4.4. Suşlar arasında tespit edilen çoklu antibiyotiğe direnç.

	<i>E. faecium</i> (n=30)	<i>E. faecalis</i> (n=25)	<i>E. durans</i> (n=7)	Toplam (n=62)
3 Antibiyotiğe direnç	4	2	3	9
4 Antibiyotiğe direnç	6	4	1	11
5 Antibiyotiğe direnç	4	0	0	4
6 Antibiyotiğe direnç	2	0	0	2

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Aksaray ilinde satışa sunulan 22 adet Tulum peyniri örneğinden izole edilen 62 suş *Enterococcus* cinsi olarak tanımlanmış ve izolatların çeşitli antibiyotiklere karşı dirençleri belirlenmiştir. 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tür düzeyinde tanısı yapılan enterokok izolatlarından, 30 tanesi *E. faecium* (%48.39), 25'i *E. faecalis* (%40.32) ve 7'si *E. durans* (%11.29) olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlama sonucunda, *E. faecium*'un diğer türlere göre daha baskın tür olduğu belirlenmiştir. Enterokoklar gibi patojen suşları bulunan bakterilerde doğru tanının yapılabilmesi önemlidir. Bu amaç doğrultusunda izolatların tür düzeyinde kesin tanısı yapılabilmesi için moleküler teknikler içerisinde 16S rRNA bölgesinin sekanslanması, biyokimyasal yöntemlere göre daha doğru ve hızlı sonuç vermesi, türler arası değişken dizilere sahip olmasından dolayı tercih edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında peynirlerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere karşı dirençlilikleri incelenmiştir. Buna göre; 62 adet enterokok suşlarının tamamı norfloksasin asite (%100) duyarlı bulunurken, ampisilin (%92), penisilin (%93.3), teikoplanin (%85.3), kloramfenikol (%79.7), siprofloksasin (%77.3), vankomisin (%70.7), tetrasiklin (%70.6) ve eritromisin (%61.2) antibiyotiklerine ise orta ve yüksek seviyede duyarlı oldukları belirlenmiştir. Enterokok türleri klinik olarak önemli olan ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmamıştır. *Enterococcus* türlerinin kullanılan antibiyotikler içerisinde sırasıyla; nalidiksik asite (%100), oksasiline (%92) ve streptomisine (%72.6) karşı orta ve yüksek seviyede dirençli oldukları tespit edilmiştir.

E. faecalis suşlarının klinik olarak önem arz eden çeşitli antibiyotiklere *E. faecium* ve *E. durans* suşlarından daha dirençli fenotipleri olduğu görülmüştür. *E. faecium* suşları; nalidiksik asit, streptomisin ve oksasilin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunurken, *E. faecalis* suşları; nalidiksik asit, streptomisin, oksasilin, tetrasiklin, vankomisin ve rifampin antibiyotiklerine ve *E. durans* suşları; nalidiksik asit, oksasilin, streptomisin ve gentamisine orta ve yüksek seviyede dirençli oldukları belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direncinin ise %41.93 olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda insan ve hayvanlarda kullanımı yaygınlaşan antibiyotiklerin LAB

yoluyla veya çeşitli yollarla direnç kazanması büyük sorun haline gelmiştir. Ticari olarak satılmakta olan LAB gıdalarda kullanımı kontrol altına alınmalı ve fermente gıdalarda starter kültür veya probiyotik olarak kullanılan mikroorganizma kültürlerinin antibiyotiğe karşı direnç özellikleri düzenli bir şekilde denetlenmeli ve çeşitli tedbirler alınmalıdır. Sonuçlar değerlendirildiğinde Aksaray'da üretilen Tulum peynirinin mikroflorasında yüksek miktarda bulunan enterokokların çoklu antibiyotik dirençliliği taşıması ve gıda yolu ile insan sağlığı açısından antibiyotik dirençliliğin yayılmasında risk teşkil ettiği kanısına varılmıştır.

Tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin yanı sıra starter veya destek kültür olarak kullanılması için bundan sonra yapılacak çalışmalarda teknolojik özelliklerinin belirlenmesi ve potansiyel diğer virülans faktörlerinin de araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M.O. ve Baptiste, K.E., 2018. Vancomycin-resistant enterococci: A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health, *Microbial Drug Resistance*, 24, 5, 590-606.
- Akaoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H. ve Sarı, K., 2017. Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21, 2, 453-459.
- Akyüz, N., 1981. Erzincan (Şavak) Tulum peynirinin yapılışı ve bileşimi, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12, 1, 85-112.
- Akyüz, N. ve Gülümser, S., 1984. Yozgat çanak peynirinin yapılışı, bileşimi ve olgunlaştırılması, *Gıda*, 9, 4, 231-236.
- Alp, D. ve Öner, Z., 2014. Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ve aroma maddeleri oluşturma özelliklerinin belirlenmesi, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayını*, 39, 6, 331-337.
- Ardıç, M., 2003. Pastörizasyon ve farklı haşlama sıcaklıklarının Urfa peynirinin kalitesine etkisi, *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Arıcı, M. ve Şimsek, O., 1991. Kültür kullanımının tulum peynirinin duyuşal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi, *Gıda*, 16, 1, 53-62.
- Armin, S., Fallah, F., Karimi, A., Rashidan, M., Shirdust, M. ve Azimi, L., 2017. Genotyping, antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* isolated from blood culture, *Microbial Pathogenesis*, 109, 1, 300-304.
- Ateş, G. ve Patır, B., 2000. Starter kültürü tulum peynirinin olgunlaşması sırasında duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15, 1, 45-56.
- Aydın, F., 2017. Yöresel bazı peynirlerdeki *Enterococcus* cinsi bakterilerin MALDI-TOF-TOF-MS yöntemi ile tanımlanması, *Yüksek Lisans Tezi*, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Aydın, F. ve Ardiç, M., 2019. Farklı illerden toplanan sıkma peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri, *Gıda*, 44, 5, 826-836.
- Ayhan, Ş., Ardiç, M., Kahve, H.İ. ve Aydın, F., 2020. Antibiotic resistance and hemolytic activity in enterococci isolated from tulum cheese sold in Aksaray province, *Gıda the journal of food*, 45, 4, 489-498.
- Baker, G.C., Smith, J.J. ve Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primes (Review article), *Journal of Microbiological Methods*, 55, 3, 541-555.

- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. ve Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.
- Bostan, K., 1991. Değişik ambalajlar içinde bulunan tulum peynirlerinin duysal, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, "Her yönüyle peynir", II. Baskı, Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayın No: 125, 249-253,
- Bostan, K. ve Uğur, M., 1992. Tulum peynirlerinde starter kültür kullanımı üzerine bir araştırma, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17, 2, 97-110.
- Bulajić, S. ve Mijačević, Z., 2004. Enterococci in cheese- phenotypization and antibiotic resistance, Acta Agriculturae Slovenica, 84, 1, 25-30.
- Bulut, Ç., 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese, master of science, İzmir Institute of Technology, İzmir.
- Bulut, Ç., Güneş, H., Okuklu, B., Harsa, S., Kılıç, S., Çoban, H.S. ve Yenidünya, A.F., 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region, Journal of Dairy Research, 72, 19-24.
- Cariolato, D., Andrighetto, C. ve Lombardi, A., 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy, Food Control, 19, 9, 886-892.
- CLSI, 2011. Performans standartları antimikrobiyal duyarlılık testi, 21. Bilgilendirici Eki, Belge M100-S21, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü.
- CLSI, 2016. Performans standartları antimikrobiyal duyarlılık testi, 26. Bilgilendirici Eki, Belge M100-S26, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü.
- Cosentino, S., Pisano, M.B., Corda, A., Fadda, M.E. ve Piras, C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese, The Journal of dairy research, 71, 4, 444-2004.
- Çalım, H.D., 2007. Konya ve çevresinde farklı tip ambalajlarda tüketime sunulan tulum peynirlerinin kalite nitelikleri, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Çelikyurt, G., 2008. Sürk peynirinin bazı özelliklerinin belirlenmesi ve izole edilen laktik asit bakterilerinin PCR yöntemiyle tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Çetinkaya, E. ve Ayhan, K., 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler, Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 2, 53-62.
- Çetinkaya, F. ve Muş, T.E., 2010. Yararları ve Riskleriyle Gıda Kaynaklı Enterokoklar, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 29, 1, 77-83.

- Çıtak, S., Yücel, N. ve Orhan, S., 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 57, 1, 27-31.
- Çöleri, A. ve Çökmüş, C., 2008. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65, 2, 87-96.
- Dağdemir, E. ve Özdemir, S., 2006. Süt ve mamullerinde enterokoklar, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu.
- Dağdemir, E. ve Özdemir, S., 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 61, 2, 133-140,
- Demir, E., 2014. Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Demir, E., Kılıç, G.B. ve Uşan, E., 2018. Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9, 2, 197-204.
- Demirel, Y.N. ve Gürler, Z., 2016. Hayvansal gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri, *Kocatepe Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9, 4, 372-378.
- Dığrak, M., Yılmaz, Ö. ve Özçelik, S., 1994. Elazığ kapalı çarşısında satışa sunulan Erzincan tulum (şavak) peynirlerinin mikrobiyolojik ve bazı fiziksel-kimyasal özellikleri, *Gıda*, 19, 6, 381-387.
- Durlu-Özkaya, F., 2001. Salamura beyaz peynirlerden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin ve biyogenamin oluşumu açısından karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- El-Din, B., El-Soda, M. ve Ezzat, N., 2002. Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products, *Le Lait*, 82, 3, 289-304.
- Eralp, M., 1967. İzmir ili süt mamulleri üzerinde araştırmalar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:304, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods, *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 2, 163-171.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Gökovalı, T., 1980. Salamuralı tulum peynirinin olgunlaşması sırasında meydana gelen mikrobiyolojik değişiklikler üzerinde Araştırma, İhtisas Tezi, 75s. Bornova-İzmir.

- Gün, İ., 2012. Alternatif kılıf uygulamalarının tulum peynirinin bazı nitelikleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2006. Peynir teknolojisinde enterokoklar-I: Biyokimyasal özellikleri ve peynir teknolojisindeki önemleri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 43, 3, 79-90.
- Hızarcı, Ö., 2011. Tulum peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve anti-listerial etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- İnoğlu, Z.N., 2013. Tulum peynirinden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının virülens faktörlerinin ve dekarboksilaz aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- İspirli, H., 2016. Erzincan tulum peynirinden laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, moleküler metotlarla tanımlanması ve ekzopolisakkarit (EPS) üretim potansiyellerinin genetik olarak belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bayburt.
- İspirli, H., Demirbaş, F. ve Dertli, E., 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese, LWT-Food Science and Technology, 75, 358-365.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., 2008. Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 1, 1-6.
- Jurkovic, D., Krizkova, L., Dusinsky, R., Belicova, A., Sojka, M., Krajcovic, J. ve Ebringer, L., 2006. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese, Letters in Applied Microbiology, 42, 6, 553-559.
- Kanak, E.K., Yılmaz, S.Ö. ve Mumcuoğlu, İ., 2018. Sakarya’da geleneksel olarak üretilen bazı yöresel peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF-MS yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22, 3, 1055-1062.
- Kara, R. ve Akkaya, L., 2015. Afyon tulum peynirinin mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri ile laktik asit bakteri dağılımlarının belirlenmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 15, 1-6.
- Karabıyıklı, Ş. ve Erdoğan, S., 2019. Peynir üretiminde mikroorganizmanın rolü ve önemli mikroorganizma grupları, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dergisi, 1, 33-45.
- Keleş, A., 1995. Çiğ ve pastörize süttten üretilen tulum peynirinin farklı ambalajlarda olgunlaştırılmasının kaliteye etkisi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Keleş, A. ve Atasever, M., 1996. Divle tulum peynirinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyu kalite nitelikleri, Süt Teknolojisi, 1, 1, 47-53.
- Kılıç, S. ve Gönç, S., 1990. İzmir Tulum Peynirinin Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar, II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27, 3, 169-185.
- Kıran, F. ve Osmanoglu, Ö., 2011. Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 62-74.
- Kırmacı, H.A., 2010. Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları, Doktora Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Kıvanç, M., 1989. A Survey on the Microbiological Quality of Various Cheeses in Turkey, International Journal of Food Microbiology, 9, 73-77.
- Koçak, P., 2014. Aydın ilindeki mandıralarda üretilip satışa sunulan beyaz, tulum, kaşar ve lor peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. ve Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analyses across computing platforms, Mol Biol Evol, 35, 1547-1549.
- Kurt, A., Çağlar, A., Çakmakçı, S. ve Akyüz, N., 1991. Erzincan tulum (şavak) peynirinin mikrobiyolojik özellikleri, Doğa-Tr. Journal of Veterinary and Animal Sciences, 16, 41-50.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Povoio, M. ve Brasca, M., 2006. *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses, International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 8, 1992-1996.
- Morul, F. ve İşleyici, Ö., 2012. Divle tulum peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23, 2, 71-76.
- Nalvuran, Z., 2013. Peynirlerden izole edilen farklı *Enterococcus* türlerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin ve bakteriyosinlerinin karakteristiklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A. ve O'Donnell, A.G., 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G.(Editörler), The Prokaryotes Vol II, Springer Verlag, Berlin, Almanya.
- Özdam, A., 2016. Peynir örneklerinden izole edilen enterobakterilerde geniş spektrumlu Beta-Laktamaz (GsbI) ve Ampc dirençlilik durumlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Özlü, H., 2015. Bazı peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneği, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özteber, M., 2013. Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Patır, B., Ateş, G., Dinçoğlu, A.H. ve Kök, F., 2000. Elazığ' da tüketime sunulan tulum peynirinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi ile laktik asit bakterileri üzerine araştırmalar, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 14, 1, 75-83.
- Patır, B., Ateş, G. ve Dinçoğlu, A.H., 2001. Geleneksel yöntemle üretilen tulum peynirinin olgunlaşması sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler üzerine araştırmalar, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 15, 1, 1-8.
- Sancak, H., İşleyici, Ö., Tuncay, R.M. ve Sancak, Y.C., 2018. Geleneksel olarak üretilen Bitlis tulum peyniri ve bazı kimyasal kalite özellikleri, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7, 2, 380-389.
- Sert, D. ve Akın, N., 2008. Türkiye'de bazı önemli tulum peyniri çeşitlerinin geleneksel üretim metotları, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Sievers, M., Teuber, M., Wirsching, F., Perreten, V., Eisenring, R., Fahndrich, P., Schlaepfer, S., Krusch, U., Simm, Ch. ve Lohmer, A., 1993. Antibiotic resistance properties of enterococci and staphylococci from fermented food, Food Micro'93. Book of Abstracts, 191p.
- Şahin, E., 1997. Pastörize ve çiğ süttten üretilen çömlek peynirinin farklı ortamlarda olgunlaştırılmasının kaliteye etkisi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Şengül, M., 1995. Çiğ ve pastörize inek sütünden yapılan ve farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırılan tulum peynirlerinin bazı kalite kriterlerinin tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şengül, M., 2001. Tulum peynirinden izole ve identifiye edilen bazı laktik asit bakteri suşlarının starter kültür özellikleri ve peynirlerin bazı özelliklerinin tespiti, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şengül, M., Türkoğlu, H., Çakmakçı, S. ve Çon, A.H., 2001 Effects of casing materials and ripening period on some microbiological properties of tulum cheese, Pakistan Journal of Biological Sciences, 4, 7, 854-857.
- Şentürk, E., 2017. Antimikrobiyel aktiviteye sahip enterokok suşlarının moleküler düzeyde tanımlanması ve antibiyotik dirençlilik düzeylerinin saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Tarakçı, Z., Küçüköner, E., Sancak, H. ve Ekici, K., 2005. İnek sütünden üretilerek cam kavonozlarda olgunlaştırılan tulum peynirinin bazı özellikleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16, 1, 9-14.
- Tatlı, D., 2009. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. ve Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680.
- Toğay, S.Ö. ve Temiz, A., 2011. Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi, Gıda, 36, 5, 303-310.
- Tuncer, B.Ö., AY, Z. ve Tuncer, Y., 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese, Turkish Journal of Biology, 37, 4, 443-449.
- Tuncer, Y., 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese, African Journal of Biotechnology, 8, 24, 7008-7016.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (10.09.2020). Süt ve Süt Ürünleri Üretimi İstatistikleri 2020 Verileri, 33701, Ankara.
- Whitenburry, R., 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria, Journal of General Microbiology, 35, 1, 13-26.
- Yaygın, H., 1971. Salamuralı tulum peynirinin yapılışı ve özellikleri üzerinde araştırmalar, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 8, 1, 91-124.
- Yelboğa, E. ve Karagüler, N. 2012. Moleküler Biyolojik Yöntemler, İçinde: Aran, N., (editör), Gıda Biyoteknolojisi İstanbul Nobel Akademi, 50-60.
- Yerlikaya, O., 2012. Süt ve geleneksel süt ürünlerinden probiyotik özellikteki *Enterococcus* türlerinin izolasyonu, tanımlanması ve İzmir tulum peyniri üretiminde destek kültür olarak kullanım olanaklarının araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yerlikaya, O., 2014. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başlıca fenotipik ve moleküler yöntemler, Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 14, 8-22.
- Yetişmeyen, A., 2005. Bazı geleneksel peynirlerimizin biyogen amin içeriğinin saptanması ve peynirlerin mikrobiyolojik, kimyasal özellikleri ile olan ilişkisinin araştırılması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

Yoğurtçu, N.N., 2011. Tulum peynirinden enterokok suşlarının izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Yoğurtçu, N.N. ve Tuncer, Y., 2013. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish Tulum cheese, International Journal Dairy Technology, 66, 2, 236-242.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Şule AYHAN

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2013-2017

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Anabilim Dalı, 2018-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Alanımda 2 yıl Aksaray ilinde özel sektörde çalıştım.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Ayhan, Ş., Ardiç, M., Kahve, H.İ. ve Aydın, F., 2020. Antibiotic resistance and hemolytic activity in enterococci isolated from tulum cheese sold in Aksaray province, Gıda, 45(4), 489-49.