

2016

YÜKSEK LİSANS

MİKROBİYOLOJİ

ECEM MALTAŞ



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
MİK-2016-00010

**MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**ECEM MALTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2016

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

**MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**ECEM MALTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

Bu Yüksek Lisans Tezi Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-15068 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ecem MALTAŞ tarafından hazırlanan "MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/12/2016

Üye : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ

Üye : Prof. Dr. K. Serdar DİKER

AÜ

Üye(Tez Danışmanı): Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışması süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a ve Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için numune toplama aşamasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

PCR çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Alper Çiftçi'ye teşekkür ederim.

A101 Aydın Bölge Müdürlüğü'nde ki Genel Müdürüm Ahmet Saatçioğlu'na ve okul ile ilgili her zaman yardımına koşan Mehmet Sağır başta olmak üzere tüm çalışanlara gösterdikleri pozitif desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardımcı olan Araş. Gör. Tuğba Yüksel'e ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman her konuda bana destek olan varlıklarıyla huzur bulduğum sevgili aileme tez zamanımda bana gösterdikleri yardımlardan dolayı çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mastitis (Meme İltihabı)	3
2.1.1. Etiyoloji	5
2.2. ENTEROKOKLAR	6
2.2.1. Genom Yapısı	6
2.2.2. Hücre Yapısı ve Metabolizma	7
2.2.3. Ekoloji	7
2.2.4. İzolasyon ve Yetiştirme	7
2.2.5. Patolojisi ve Virulens Faktörleri	9
2.2.6. Enterokoklardan Meydana Gelen İnfeksiyonlar	11
2.3. BİYOFİLM	12
2.3.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları	12
2.3.2. Süt Endüstrisinde Biyofilm	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Gereç	16
3.1.1 İzolasyon Örnekleri	16
3.1.2 Besiyerleri	16
3.1.2.1. Enterococcal Agar (EA)	16
3.1.2.2 Kanlı Agar (KA)	16
3.1.2.3. Kongo Red Agar (CRA)	17
3.2 Yöntem	17
3.2.2 <i>Enterococcus</i> Şüpheli Örneklerinin Belirlenmesi	17
3.2.2.1. Katalaz Testi	18
3.3. İzolasyon Örneklerinin PCR Yöntemiyle Belirlenmesi	18
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu	18
3.3.2. Primerler	19
3.4. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi	19

3.4.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi.....	19
4. BULGULAR	21
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	21
4.2. PCR Bulguları	21
4.3. Sonuçlar	22
4.4. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak İncelenmesine Ait Bulgular.....	22
5. TARTIŞMA.....	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	26
KAYNAKÇA	27
ÖZGEÇMİŞ.....	31



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E.A: Enterococcal Agar
K.A: Kanlı Agar
CRA: Kongo Red Agar
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EPS: Ekzopolisakkaritler
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
bp: Baz Çifti
Kbp: Kilo Baz Çifti
ml: Mililitre
mg: Miligram
g: Gram
EtBr: Etidyum Bromür
GN: Gümüş Nitrat
°C: Santigrat Derece
G: Guanin
C: Sitozin
G(+): Gram Pozitif

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm Oluşum Aşamaları	13
------------------------------------	----



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Mastitisli Meme Örneği.....	4
Resim 2. Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış Gram pozitif koloniler ...	18
Resim 3. Kongo red agara ekim yapılan Örneklerin inkübasyon sonrası slime görünümü	20
Resim 4. Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği bakımından Kongo Red Agarda incelenmesi.....	23



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Klinik Mastitise Neden Olan Risk Faktörleri.....	4
Tablo 2. Bazı Gram Pozitif Kokların Özellikleri.....	8
Tablo 3. <i>Enterococcus</i> türleri tarafından üretilen bakteriyosinler.....	11
Tablo 4. Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdentifikasyon Bulguları.....	21



ÖZET

MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROKOKLARIN* BİYOFİLM ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

**Maltaş E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana
Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.**

Mikrobiyal kökenli mastitis, tüm dünyada sığırcılığın en çok ekonomik kayba neden olan hastalığı olarak kabul edilmektedir. Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, sığırlarda verim düşüklüğü, ürün kaybı ve tedavi masrafları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açabildiği gibi, insan sağlığı açısından da risk oluşturabilmektedir. Enterokoklar, biyofilm yapısına katılan çeşitli virulens faktörler sayesinde insanları ve evcil hayvanları enfekte ederler. Enterokok türlerinin çoğu en az bir antibiyotiğe karşı dirençlidir ve biyofilm yapısının bu dirence katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan bu türlerde meydana gelen yüksek dirençliliğin insan sağlığı için de risk teşkil edebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle konu ile ilgili olarak daha detaylı araştırma ve denemelerin yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda *Enterococcus spp.* izolasyonu için Aydın bölgesinden sağlıklı ve mastitisli sığırlardan alınan 100 adet süt örneğinden, 9 (% 9) adet örnek *Enterococcus spp.* olarak izole edildi. Bu 9 adet suş biyofilm yapısı incelenmek üzere Congo Red Agara (CRA) ekildi. 6 (% 66) suş biyofilm oluşumu yönünden pozitif olarak değerlendirilirken, 3 (% 33) suşta ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *Enterococcus*, Biyofilm.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SLIME PRODUCTION OF *ENTEROCOCCUS SPP.* STRAINS ISOLATED FROM MASTITIS MILK

Maltaş E. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2016.

Microbial origin of mastitis, the whole world is considered to be a disease of cattle that causes the most economic loss. Clinical and subclinical character, which can be acute and chronic mastitis, yield loss in cattle, as can lead to economic losses due to product loss and treatment costs can pose a risk in terms of human health. Enterococci, thanks to a variety of virulence factors involved in the biofilm structure for people and pets can become infected. It is resistant to many antibiotics at least one of *Enterococcus spp.* and biofilm structure is thought to contribute to this resistance. Biofilm forming a high resistance to human health, is thought to occur in these types may pose a risk. Therefore, as is required on the subject of further research and testing.

In our study, the Aydın region for the isolation of *Enterococcus spp.* healthy and mastitis than 100 milk samples from cattle, 9 (9%) samples were isolated as *Enterococcus spp.* This 9 pieces of straining biofilm structure Congo Red Agar for review (CRE) was planted. 6 (66%) strains aspect of biofilm formation was positive in 3 (33%) of the biofilm formation was not observed in the strain.

Keywords: Mastitis, *Enterococcus*, Biofilm.

1.GİRİŞ

Mastitis hayvanlarda sıkça görülebilen önemli bir meme hastalığıdır. Özellikle süt işletmeleri için küçümsenemeyecek derece de süt kayıplarına, pahalı tedavi giderlerine ve zaman kaybına sebebiyet verdiği için hastalığın kontrolü oldukça önemlidir (Gürgen 2015).

Son yıllarda infeksiyon kaynaklı hastane başvurularında, bu infeksiyonlara neden olan bakterilerin dağılımında bir çok değişiklikler olmuştur. Enterokoklar infeksiyon sıralamasında *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* 'tan sonra üçüncü sırada yer almaktayken, hastalık oranında yirmi kat artış olmuş ve 1990 yılından sonra %16'lık bir oranla *E. coli*'den sonra ikinci sıraya geldiği gözlemlenmiştir. İnsan vücudunun belirli bir kısmında normal florada bulunan bu bakterihastalık zamanında aktif olup hastaları daha kolay infekte edebilmeleri, yaygın kullanılan antimikrobiklere karşı dirençli olması ve bu yüzden de tedavilerde güçlük çıkarabilmeleri sebebiyle zararlı bir patojen olmaktadır.

Enterokoklar ilk bağırsak kökenli bakteri olarak sınıflandırıldığında Streptokokların içine dahil edilmiştir. İlk Enterokok ismi 1899 yılında Thiercelin tarafından kullanılmış ve dökümanlara bu şekilde geçmiştir.

1937'de Sherman'ın sınıflamasıyla Streptokoklar dört gruba ayrılmıştır. 1984 yılında Bergey's Manual'de Enterokokların yeni bir cins olarak sınıflandırılması desteklenmiştir. Böylece önceleri, hücre duvarı antijen yapısına göre Lancefield tarafından D-grup Streptokoklar içinde gösterilen Enterokokların, D-grup Streptokoklardan farklı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan DNA:DNA ve DNA: r-RNA hibridizasyon yöntemleriyle yeni Enterokok türleri belirlenmiştir. Henüz tamamı klasik kitaplara girmemiş 19 tür Enterokok vardır (Ural 1998).

Biyofilm yapısı; bir ya da daha fazla mikroorganizma türünün karbonhidrat bir matriks ile bir arada tutulduğu, besinlerin taşınması ve atıkların uzaklaştırılması amacı ile su kanalları ihtiva eden yüksek organizasyonlu yapılardır. Biyofilm yapısı, ekzopolisakkarit ve protein film tabakası ile içerisinde bulunan mikroorganizmalar için bir kalkan görevi görür ve bu yapıdaki bakterileri öldürmek, planktonik formdaki bakterilere kıyasla çok daha zordur. Biyofilm yapısındaki bakterilerin fagositoz, antikor ve antibiyotiklere karşı 1000 kata kadar daha dirençli oldukları bilinmektedir. Enterokoklar: jelatinaz, agregasyon maddeleri, kapsül yapısı ve enterokokal yüzey proteini gibi biyofilm yapısına katılan çeşitli virulens faktörler sayesinde insanları ve evcil hayvanları enfekte ederler. Enterokok türlerinin çoğu en az bir

antibiyotiğe karşı dirençlidir ve biyofilm yapısının bu dirence katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Dıanı ve ark 2015).

Tüm dünyada, mikroorganizmaların neden olduğu mastitis sığır yetiştiricilerinin en çok ekonomik kayba neden olan hastalığı olarak bilinmektedir. Sığırlarda mastitis çok sık görünmesi dışında ekonomik kayıplara neden olduğundan önemli bir problemdir. Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, sığırlarda verim düşüklüğü, ürün kaybı ve tedavi masrafları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açabildiği gibi, insan sağlığı açısından da risk oluşturabilmektedir (Savaşan ve ark 2004).

Kary Mulis tarafından ilk olarak 1985 yılında yapılan bir uygulamadır. Belirli bir DNA parçasının kopyalanmasını ve çoğaltılmasını sağlayan in vitro bir yöntemdir.

Uygulamada ilk olarak DNA sarmalı yüksek sıcaklık etkisiyle birbirinden ayrılır. Sonra sıcaklık düşürülür ve bu sayede oligonikleotid primerler çoğaltılacak olan DNA parçası üzerine karşılıklı olarak eşlenik sekanslara bağlanır. DNA Polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklara dayanıklı bir enzimdir. Primerlerin bağlamasından sonra Polimeraz reaksiyonun gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa düşürülür. Bunun sonunda primerler uzatılır ve primerlerin arasında kalan bölge sentezlenir. Sarmallar tekrar denature edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezitekrartekrargerçekleşir 20-50 döngü arasında işlem tekrarlanır.

PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkısı Taq Polimeraz (*Thermus aquaticus*) enziminin bulunması yapmıştır. Bu enzim ilk olarak Yellowstone milli parkında bir kaplıcada yaşayan termofilik bir bakteriden izole edilmiştir (Saiki ve ark 1988).

Bu çalışma ile Aydın ilindeki sığırlarda mastitisli sütlerden izole edilen *Enterococcus spp.* suşlarında biyofilm üretme yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda Enterokok izolasyonu için Aydın bölgesinden sağlıklı ve mastitisli ineklerden alınan süt örnekleri kullanılmıştır. Toplanan materyallerden izole edilen Enterokoklar fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilerek, biyofilm yetenekleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Mastitis (Meme İltihabı)

Meme bezlerindeki yangı "mastitis" olarak tanımlanır. Bu kelime Yunanca *mastos* meme, *itis* yangı kelimelerinden türetilmiştir. Genel olarak meme ucundaki salgıdan patojenik bakterinin girerek iç bezleri etkilemesi sonucu gelişir. İç bezlerdeki ortam da bakteri çoğalmasına çok uygun ise bakteri gelişimi ve metabolizması sonucu hassas dokular iltihaplanarak yangı şekillenir. Mastitisin ciddiyeti bakteri enfeksiyonunu oluşturan bakteri sayısına, sığır metabolizmasına ve meme bezlerindeki süt alveollerine ve çevre faktörlerinden kaynaklanan baskı derecelerine bağlıdır. Klinik mastitis yangı, şişme, sıcaklık, kızarıklık, ağrı ve buna bağlı fonksiyon bozuklukları ile baş gösterir. Saha lezyonları görülmeksizin yangı varlığı durumunda *subklinik mastitis* görülür. Subklinik mastitis tayini süte oluşan yangı belirtileri (lökosit, fibrin klot, serum) ve kandan süte sodyum klorür ve bikarbonat transferi ile pH'nın daha alkali olmasından kaynaklanan kimyasal kompozisyondaki değişme ile teşhis edilir. Mastitis, etkenin kaynağına göre 2'ye ayrılır :

1) Kontagiyöz mastitis hayvandan hayvana veya bir meme lobundan diğerine bulaşma ile oluşur. *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma* türleri başlıca etkenlerdir.

2) Çevresel mastitis hayvanın yaşadığı ortamda (su, toprak, gübre, ahır vs) bulunan bakterilerin herhangi bir dönemde (kuru ve laktasyon) oluşturduğu enfeksiyondur. Daha çok klinik mastitise neden olur. Gram (-) bakterilerden Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*), *Pseudomonas spp.*, çevresel *Streptococcus spp.* (başlıca *Streptococcus uberis* daha seyrek *Streptococcus dysgalactia*) türleri ve *Enterococcus faecalis* rol oynar (Keskin 2011).

Meme dokusunun tahribatı ile birlikte süt veriminin giderek azalmasına hatta bazen durmasına sebep olan mastitis, önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu bakımdan hayvanların mastitise yakalanmamaları için düzenli bir bakım ve beslenmeyle, sütlerinin belirli aralıklarla muayeneleri gerekir (Resim 1). Mastitisli sütler insan sağlığını etkilediği kadar, buzağı sağlığını da etkilemektedir. Yapılan tedaviden, beklenen neticeler alınmayabilir. Bunun nedeni, meme dokusunun yapı özelliğinden dolayı, kullanılan ilaçların infekte bölgelerdeki mikroorganizmaları doğrudan etkileyememesidir. Diğer bir neden ise

antibiyotiklerin yeterli miktarlarda ve sürede kullanılmamaları ve de ilaçlarda zamanla bir bozulmanın olması olabilir (Deveci ve ark 1985).



Resim 1. Mastitisli meme örneği (Gürgen 2005)

Klinik mastitise neden olan risk faktörleri tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Klinik Mastitise Neden Olan Risk Faktörleri (Özlüer, 2010)

İnekle ilgili;	
Risk Faktörleri	Amaç
Genel olarak hastalıklara direnç	
Negatif enerji Dengesi	<%10 inek
Rumen dolgunluk skoru	3
Meme başı yerleşimi	Bir örnek
Meme başı kallozite puanı	%85 < 2
İnek temizlik skoru	%85 ‘i 1
Çevre ile ilgili;	
Risk Faktörleri	
Enfeksiyon baskısı	
Sağım pratiği	
Sağım hijyeni	
Genel ahır hijyeni	
Yataklık hijyeni	
Ahır içi havalandırma	
Yönetimsel olan;	
Mastitis tanı protokolü	
Tedavi protokolü	
Kuru tedavi protokolü	
Kesim stratejisi	

2.1.1. Etiyoloji

Bu hastalığa sebep olan bakterileri endojen ve ekzojen olarak 2 ayrı sınıfta toplayabiliriz.

Streptococcus agalactia: Subklinik mastitislerde karşımıza çıkmaktadır. Enfekte memeler, altlık, sağım makinaları ve sağıcılar enfeksiyon nedeni olarak gösterilebilirler. Yavruların enfekte memeyi emmesiyle de hastalık bulaşabilir. Bu hastalığın tedavisinde Penisilin başarılı sonuçlar vermektedir.

Staphylococcus aureus: Bu mikroorganizmanın mastitisli tedavisi oldukça güçtür. Antibiyotiğe karşı direnç gösterirler. Bunun sebebi ise etkenin memede yıkım sonucu fibröz doku oluşturması ve bu sebeple antibiyotığın iç alana etki edemeyip dağılımının önlenmesidir. Bu tür inekler genelde kesime gitmektedir

Corynebacterium bovis: Bu mikroorganizma uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin olduğu yerde üremeyi severler. Bu sebeple sütte yağlı bölgelerde fazlaca bulunurlar. Sağım sırası bulaşma mevcut olup, sağımdan sonra etki göstermezler. *S. agalactia* ile aynı şartlara sahiptirler. Yaşlı ineklerde görülme oranı yüksektir. Zamanla süt verimliliğinde azalma görülmektedir. Tedavi ile iyileşme oranı % 40'tır.

Mycoplasma bovis: Birden fazla meme lobunu etkileyen bu mikroorganizmadan standart mikrobiyolojik yöntemlerle izlenilemediği zaman şüphelenilmelidir. Penisilinler hariç diğer antibiyotiklere duyarlıdır fakat kolay kolay tedavi edilemez. Dış görünüşte mikroorganizma kendini belli etmese de içeride ciddi yangılara sebebiyet verdiği için bu türle enfekte olmuş hayvanlar genelde kesime gönderilir.

Nocardia türleri: *Candida*, *Bacillus*, *Serriata*, *Pasteurella* ve *Prototheca* türleri, çeşitli maya ve mantarlar mastitise yol açabilmektedir. Toprak, su ve çürümekte olan bitkilerde bulunurlar. Meme içine antibiyotik verilerek tedavisi yapılmaktadır.

Pseudomonas aureginosa: Antibiyotik tedavisine karşı dirençli olan bu mikroorganizmalar endotoksinleri sebebiyle toksemiye yol açarlar. Sağım sonrası kontamine olmuş su kullanımı başlıca etkindir.

Arcanobacterium pyogenes (*Actinomyces pyogenes*): Bu mikroorganizmanın bulaşmasına sinekler etken olmaktadır. Uzun süreli bir hastalık olup memede körlemeye kadar gidebilmektedir.

Koliformlar: Koliformlar akut mastitise sebep olan mikroorganizmalardır. Yaz aylarında ve doğuma yakın ineklerde özellikle semptomlar belirgin bir artış göstermektedir. Süt sulanmış, yeşilimsi bir görüntüdedir (Altınsoy, 2008).

2.2. Enterokoklar

Yunanca ‘entero’ bağırsak ve ‘coccus’ granül kelimeleriyle adlandırılan Enterokoklar daha önceleri Streptokok grubunun içinde yer almaktaydı. Enterokok ismini ilk kez 1899 yılında Thiercelin bir makalede kullanmıştır. 1984 yılında DNA hibridizasyonları sonucu *S. faecalis* ve *S. faecium*’un Enterokok ailesine ait olduğu tanımlanmıştır. Günümüzde Enterokokların 19 türü bulunmaktadır. Bunlar; *E. fecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. gallinorum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* ve *E.pseudoavium*, *E.haemoperoxidus*, *E.villorum*, *E. phoeniculicola*, *E.canis*, *E.moraviensis*, *E. columbae* ve *E. cecorum*’dur (Tok 2006).

Enterokoklar gıdalardaki önemi olan laktik asit bakterilerinin (LAB) bir parçasını oluştururlar. İşlenmiş etleri bozabilir, ancak diğer taraftan da özellikle Akdeniz bölgesinde üretilen bazı peynir ve sosislerin olgunlaşması ve aroma geliştirilmesi için önemlidirler. Enterokoklar ayrıca insan probiyotikleri olarak da kullanılır. Bununla birlikte, bunlar bakteriyemi, endokardit ve diğer enfeksiyonlara neden olan önemli nozokomiyal patojenlerdir (Konrad ve ark 2003).

Bacteria; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Lactobacillales*; *Enterococcaceae*; *Enterococcus*
Species: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (Microbe Wiki 2011).

2.2.1. Genom Yapısı

Enterococcus faecalis V583 genomu son günlerde dizilenmiştir. Ana kromozom 3.218.031 bp uzunluğundadır. Ana kromozomun G + C içeriği % 37,5 olarak belirtilmiştir. Virulens faktörleri ile ilgili olarak, araştırmacılar *E. faecalis* genomu üzerinde bir patojenite adası belirlemişlerdir. Bu bölge, genomun geri kalan kısmından daha düşük G + C içeriğine sahiptir ve 150 kb uzunluktadır. Ayrıca diğer cinslerin, özellikle Streptokoklar ve Stafilokoklar’ın *E. faecalis* genomu üzerindeki birçok yatay gen transferi ile elde edilmiş olduğu düşünülmektedir. *E. faecalis* genomu üzerinde % 37 G + C içeriği ile en uzun 2848380 baz çifttir.

Vankomisin şu anda başka antibiyotiklere yanıt bekleyen bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde son çare olarak kullanılan bir antibiyotiktir. *Enterococcus faecalis* dahil ne yazık ki birkaç bakteri türü, son savunma hattına karşı direnç geliştirmişlerdir. *E. faecalis* vankomisin direnci genomuna DNA’nın bir cep elemanı üzerinde kodlanır.

2.2.2. Hücre Yapısı ve Metabolizma

Enterokoklar fakültatif anaerob, gram pozitif koklardır. Laktik asiti karbonhidrat dönüştürmek için bir fermente metabolizmaları vardır. Bunlarda solunum sistemi olmadığı için Krebs döngüsüyle fermente edilirler. *E. faecalis* türünde katyon homeostazi mekanizmaları vardır ve bunlar büyük olasılıkla pH, tuz, metal ve kurumaya karşı dayanıklılıkta katkı sağlarlar. Enterokoklar genellikle katalaz negatiftirler, bazı testlerle pozitiflik gösterebilirler. Hücre duvarlarında Lancefield D Grubu antijeni (gliserol teikoik asit antijen) sahip olması D Grubu Streptokoklar olarak sınıflandırılması için kullanılmıştır.

2.2.3. Ekoloji

Enterokoklar kuşkusuz diğer bakterileri öldürecek birçok ortamlarda yaşayan yetenekli, son derece cesur organizmalar olarak tarif edilmiştir. Genellikle hayvanların bağırsaklarında ve insanlarda bulunurlar. Toprak seleksiyonu ve yüzey suyu hayvan dışkılarıyla birlikte muhtemelen kirlenmeye yol açmaktadır. Enterokoklar 10-45°C arasında bir sıcaklık aralığında büyüme yeteneğine sahiptir ve hipotonik, hipertonic, asidik ya da bazik ortamlarda büyüyebilir. Ayrıca 30 dakika boyunca 60 derece Celsius'ta hayatta kalma yeteneğine sahiptir. *Enterococcus faecalis* % 6.5 NaCl içinde büyüebilmektedir. *Enterococcus*, aynı zamanda % 40 safra tuzları ve geniş bir pH aralığında büyüyebilir. Enterokoklar doğal antibiyotiklere karşı büyük direnç gösterirler.

2.2.4. İzolasyon ve Yetiştirme

Gıda, yem, çevresel ve klinik örneklerdeki önemi nedeniyle, enterokokların saptanması ve sayımı, günlük rutinde değil, aynı zamanda mevcut araştırma faaliyetlerinde de önemli bir konudur. Çeşitli amaçlar için çeşitli medya ve protokoller yayınlanmıştır, ancak evrensel olarak tüm gereksinimleri karşılayan tek bir yöntem mevcut değildir. Eşlik eden mikrofloranın niteliğine ve seviyesine bağlı olarak, çeşitli dezavantajlar ve avantajlar dikkate alınarak belirli substratlar ve modifikasyonları kullanılmalıdır.

VRE, sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlarda yer aldığı için çoğu uygulamalara (suyun, farklı gıdaların, bağırsakların ve diğer klinik örneklerin incelenmesi) ek olarak, vankomisine

dirençli enterokokların (VRE) tespiti için de önemli bir görev üstlenmiştir (Konrad ve ark 2003).

Enterokoklar kanlı agarlar da izole edilebilir. Bunlar safra eskülinazid, feniletıl alkol agar, Columbia kolistin-nalidiksik asit agar veya azit içeren başka bir ortam kullanan bir numunede Gram negatif bakterilerden ayırt edilebilirler. 35-37 santigrat derece havalandırma olmadan yetiştirilebilirler (Microbe Wiki 2011).

Enterococcosel Agar, Isenberg ve ark.'nın daha sonradan safra konsantrasyonunu azaltarak ve sodyum azid ekleyerek modifiye ettiği Rochaix'in Safra Eskülin Agar formülasyonunu temel alır. Bu besiyeri enterokokların izolasyonu için standart bir formülasyondur. İki pepton besin sağlar. Grup D Streptokoklar (Enterokok da dahil olmak üzere) eskülini eskületin ve glikoza hidrolize eder. Eskületin bir demir tuzu ile reaksiyona girerek koyu kahverengi veya siyah bir kompleks oluşturur. Ferrik sitrat bir indikatör olarak dahil edilir ve kahverengi ile siyah bir kompleks oluşturmak üzere eskületin ile reaksiyona girer. Enterokoklar dışındaki gram-pozitif bakterileri inhibe etmek için oksgal kullanılır. Sodyum azid, gram-negatif mikroorganizmalar için inhibitördür.

İdentifikasyonu da biyokimyasal ve fizyolojik testlere göre yapılır (Dizbay 2012).

Tablo 2. Baz gram pozitif kokların özellikleri

GENUS	VAN	GAZ	LAP	ESKÜLİN	KATALAZ	%6,5 NaCl Üreme	10° C ÜREME	45° C ÜREME	HEMOLİZ	MOTİLİTE
<i>Enterococcus</i>	S-R	-	+	+	-	+	+	+	$\alpha\beta n$	D
<i>Lactococcus</i>	S	-	+	+	-	D	+	D	αn	-
<i>Vagococcus</i>	S	-		+	-	+	+	D	αn	-
<i>Streptococcus</i>	S	-	+	D	-	D	-	D	$\alpha\beta n$	-
<i>Abiotrophia</i>	S	-	+	-	-	-	D	-	αn	-
<i>Globicatella</i>	S	-	-	-	-	+	-	-	α	-
<i>Leuconostoc</i>	R	+	D	D	-	D	+	D	αn	-
<i>Pediococcus</i>	R	-	+	D	-	D	-	+	α	-

VAN: Vankomisin

GAZ: Glikozdan Gaz Oluşumu

LAP: Lösın Amino Peptitaz

D: Değişken

+ : Pozitif Reaksiyon

-: Negatif Reaksiyon(Akdemir)

2.2.5. Patolojisi ve Virulens Faktörleri

Enterokoklar bakteriyemi, mesane enfeksiyonları, endokardit olgular gibi bir çok klinik enfeksiyonda rol oynayabilen canlılardır. Tıbbi açıdan bakıldığında bu türün en önemli özelliği antibiyotik dirençliliklerinin yüksek olmasıdır (Adolfo 2007).

Bazı suşlar birçok antibiyotiğe dirençlidir, ancak antibiyotik direnci tek başına bu bakterilerin bazılarının virulansını açıklayamaz. Yapay genler, invasinler (mikroorganizmanın bir konağa girme, orada gelişebilme ve konağın vücudunda yayılarak üreme yeteneği) ve hemolizin (alkol, eter, bakteriyel toksin) gibi virülans faktörleri tanımlanmıştır.

Enterokokların hastalıklardaki rolü, gıdalarda kullanım güvenliği veya probiyotik konularında sorular ortaya çıkarmıştır. Gıdalardan izole edilen enterokok suşları arasında virulens özellikleri insidansı ile ilgili çalışmalar genellikle *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* üzerine yapılmıştır.

Bir başlangıç veya probiyotik kültür olarak kullanılmak için bir Enterokok suşu göz önüne alındığında, her bir suş dikkatli bir şekilde bilinen tüm hastalık oluşturma faktörlerinin varlığı açısından değerlendirilmelidir. İdeal olarak, bu suşların hiçbirinde virulens belirleyicileri bulunmamalı ve klinik olarak ilgili antibiyotiklere duyarlı olmalıdır.

Enterokokların en önemli virulens faktörleri şu şekildedir:

1. Sitolizin
2. Agregasyon faktörü
3. Ekstraselüler süperoksitler
4. Enterokokal yüzey proteini
5. Jelatinaz
6. Lipoteikoik asit
7. Kollajen Bağlayıcı Adezin MSCRAMM Ace
8. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri
9. Seks feromonları
10. Hyaluronidaz
11. Efa
12. AS-48
13. Antibiyotik direnci

Genel olarak, *E. faecium*, gıdalarda kullanım için daha düşük bir risk oluşturduğu görülmektedir, çünkü bu suşlar genellikle *E. faecalis*'e göre daha az tanınmış virulens belirleyicileri barındırmaktadır. Genellikle, *E. faecium* suşları arasında böyle virulens

belirleyicilerin görülme sıklığı, *E. faecalis* suşları ile karşılaştırıldığında, muhtemelen feromon duyarlı plazmidlerin varlığının bir sonucu olarak düşüktür (Konrad ve ark 2003).

Taksonomi

Gram pozitif, spor oluşturmeyan fakültatif anaerob, katalaz negatif bakterilerdir. Tek koklar şeklinde görülebildiği gibi zincirli şekillerde de görülebilirler. Enterokoklar olarak bilinen ve bakteriyosinleri üreten laktik asit bakterileri bu gruptadır.

1984 yılında yapılan DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA dizilimi sonucu bu türler tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucu yeni türün Streptokoklardan farklı olduğu ortaya konulmuş ve Enterokok olarak isimlendirilerek bakteri alemine tanımlanmışlardır.

D grubu antijen hem Streptokoklarda hem de Enterokoklarda bulunur. Bu çalışmayla dokuz tür Streptokoklardan Enterokoklara geçmiştir.

E. faecalis ve *E. faecium*'daki genomik farklılıklar rekabetçi bir DNA hibridizasyonu ile sonuçlandırılmıştır. Enterokok genomunun %6,4'ün de bağlı hücre yüzey proteinleri vardır ve bu iki cins arasındaki farklar %22,6 oranla bu genlerde bulunmaktadır (Katie ve Carol 2009).

Fizyoloji

Bu türler 5-50⁰C arasında üreme göstermektedirler. Minimum ve maximum sıcaklıklar Rosso modeline göre 6,5 ve 42,7, aerobik koşullarda ise 47,8 derecedir. %5 koyun kanı içeren Columbia agar ve Tyrypticase soy agarda Enterokok üremesi sağlanıp hemoliz olayı gözlemlenebilir.

E. faecalis ve *E. faecium*'da optimum ph 7,5 olmakla birlikte 4,6-9,9 arasında değişmektedir. Safra tuzlarını %40 yoğunlukta tolere edebilmektedirler. *E. faecalis* %6,5 NaCl'de büyüme yapabiliyor. Ph, tuz, metal ve kurumaya karşı dayanıklıdır (Katie ve Carol 2009).

Bakteriyosinler

Bakteriyosinler ribosomal sentez ile yakından ilişkili hücre dışı serbest antimikrobiyal peptidlerdir. Bakteriyosini üretmek için dört gen gereklidir: Bir ön peptide kodlayan yapısal gen, özel bir bağışıklık geni, özel bir ABC bağışıklık geni ve bakteriyosin verilmesi için protein kodlayan gen'dir. N-terminalinden peptidin çıkarılması ile bakteriyosin verilmesi başlamış olur.

Bakteriyosinler çok az veya hiç sistin içermeyen bir ortamda katyonik, amfifilik protein ve bu benzerdeki yapılar sayesinde sulu koşullar altında rastgele bobin şeklinde meydana gelirler.

Tablo 3. Enterokok türleri tarafından üretilen bakteriyosinler

Bakteriyosin	Üretilen	İzole Form	Boyut
Enterosin A ve B	<i>E. faecium</i> P21	Domuz Sucuğu	
Enterosin EJ97	<i>E. faecalis</i> S-47		
İsimsiz	<i>E. faecium</i> A2000	Peynir	
Enterosin CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	Peynir	3500
Bakteriyosin15	<i>E. faecium</i> N15	Nuka	3000-5000
Enterosin A ve B	<i>E. faecium</i> WHE81	Peynir	4833 ve 5462
İsimsiz	<i>E. faecium</i> RZS C5 ; <i>E. faecium</i> DPC 1146		
AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48	Domuz bağırsak sistemi	
Enterosin 012	<i>E. gallinarum</i>	Devekuş Duedonumu	3400
İsimsiz	<i>E. faecium</i> CRL 1385	Serbest gezen tavuklar	
Enterosin P	<i>E. faecium</i> P13	Fermente sosis	
Enterosin 1021A ve 1071B	<i>E. faecalis</i> BFE 1071	Minipigs feçesi	4285 ve 3899
Mundtikin ATO6	<i>E. mundtii</i> ATO6	Sebzeler	4287
Mundtikin KS	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	Ot silajı	4290

2.2.6. Enterokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Enterokoklar vücudun değişik bölgelerinde infeksiyonlara neden olabilir. Bunlar;

1. Endokardit,
2. Üriner sistem infeksiyonları,
3. Bakteriyemi,
4. Osteomyelit,
5. Santral sinir sistemi infeksiyonları,
6. Deri ve yumuşak doku infeksiyonları,
7. Solunum sistemi infeksiyonları,
8. İntraabdominal ve pelvik infeksiyonlar,

9. Gastrointestinal sistem infeksiyonları,
 10. Neonatal infeksiyonlar.
- Bunlardan en önemlisi Bakteriyemidir. (Ural 1998).

2.3. Biyofilm

Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunarak kendi bünyeleri tarafından ürettikleri polimerik jelsi bir tabaka olarak tanımlanmaktadır (Leona ve ark 2006). Biyofilmin oluşumu canlı hücrelerde (in vivo) veya cansız hücrelerde (in vitro) gerçekleşmektedir. Bazı koşullar biyofilm oluşumunu etkileyebilmektedir. Örneğin besin miktarının ve nemin fazlalığı biyofilm oluşumunda artışa sebep olmaktadır. Bunun yanında bakteri suşu, pH, sıcaklık ve yüzey özellikleri gibi çeşitli çevresel faktörlerde biyofilm oluşumuna etki etmektedir (Borucki ve ark 2003, ChaevSchraft 2000).

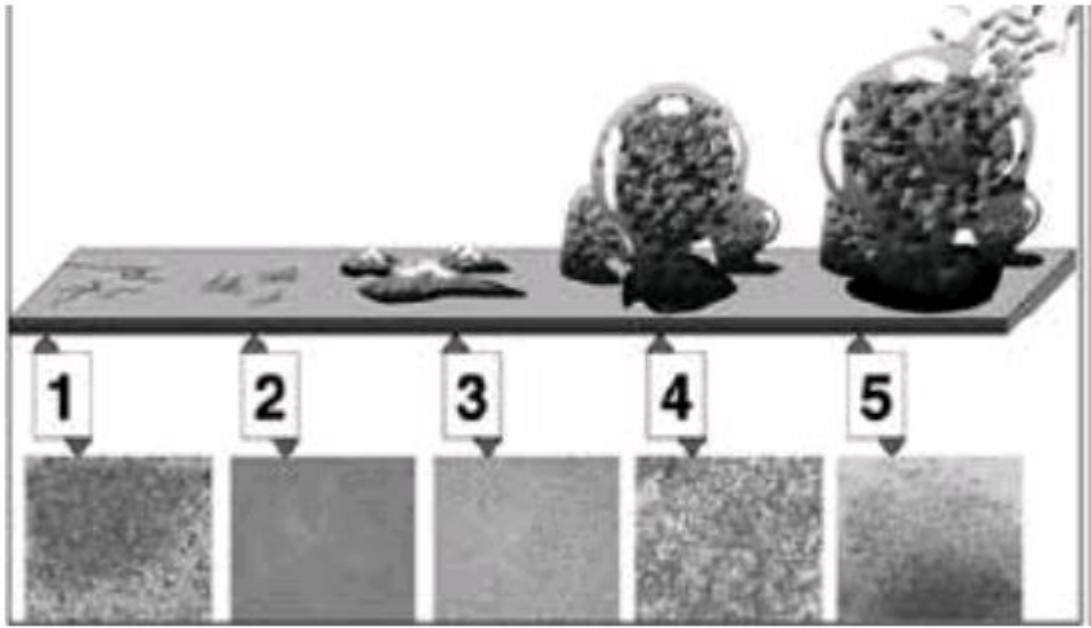
Biyofilm tabakası özellikle de gıdalarda patojen bakteriler için kolayca oluşturulup kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Aksu ve ark 2011). Biyofilm oluşumunda bakteriler kendi kolonisini oluşturabildiği gibi çeşitli bir grup bakteri bir araya gelip hepsi kendine özgü mikrokoloni de oluşturabilmektedir ve bu koloniler birbirinden su kanalları ile ayrılabilirler. Bu su kanallarında bulunan sular sayesinde besin ve oksijenin difüzyonu sağlanmış olmaktadır. Yapısındaki maddeler birbirine ekstrasellülmatriks ile bağlanmaktadır. Su bakterilerin içindeki hücre kapsüllerinde bulunur veya mikroorganizmaların monosakkaritlerden oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı polimer olan ekzo polisakkarite (EPS) bağlanmaktadır (Ölmez 2009).

2.3.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Bakterilerin biyofilm yapısı çok farklı çerçevelerde oluşuyor diyebiliriz. En basit bir biyofilm yapısı bile oldukça karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Biyofilmin çözülebilmesi ve karmaşıklığını bitirebilmesi ortamdaki besin maddelerine bağlıdır. Zamanla bu besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler planktonik hallerine geri dönerler (Gün ve Ekinci 2009).

Biyofilm oluşum aşamasını beş basamakta inceleyebiliriz. Bunlardan ilki hücrelerin yüzeye etkileşerek yüzeye tutunmasıdır. Bakteriler bu tutunmayı gerçekleştirirken aynı

zamanda o yüzeyde besin maddesi olup olmadığını da araştırırlar. Besin maddelerinin varlığı sonucunda hücreler tutunma için ikinci aşamaya geçerler. Bu aşamada hücreler organelleri sayesinde dipol-dipol, hidrofobik, hidrojen, iyonik-kovalent bağlar ve iyon-dipol etkileşimleriyle hücre yüzeyine dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Yüzeye tutunan bakteri gelişir, büyür ve koloni oluştururlar. Mikrokolonilerde zamanla büyür ve yüksek yapılara dönüşürler. Artık olgun bir biyofilm oluşmuş durumdadır. Bakterilerin biyofilmden ayrılması veya kopması tek koloni ya da bakteri kümeleri şeklinde ortama yayılarak meydana gelmektedir (Srey ve ark 2012).



Şekil 1. Biyofilm Oluşum Aşamaları (Srey ve ark 2012)

- 1: Geçici (arayış) Tutunma
- 2: Besin Varlığı Sonucu Kalıcı Tutunma
- 3: KoloniGelişimi
- 4: Biyofilm Olgunlaşması
- 5: Biyofilm Hücrelerinin Ortamdan Ayrılması

1. Geçici (arayış) Tutunma: Bakteri yüzey ile ilk karşı karşıya geldiğinde tam olarak temas etmemektedir. Ancak yüzey ile arasında uzaktan etkileşimler meydana gelmektedir. Bakterinin yüzeye tutunması ortamın ph, sıcaklık, nem ve besin değerleri gibi çevresel koşulları ile alakalıdır (Donlan 2002, Gerstel ve Römling 2001). Yüzeydeki bu bakteriler

bağımsız hareket etme yeteneğindedirler ve çok az EPS'ye sahiptirler (O'Toole ve Kolter 1998).

2. Kalıcı Tutunma: Çevre şartlarının uygunluğuyla birlikte bakteri artık yüzeyde kalıcı tutunmaya geçer. Bunu EPS varlığıyla gerçekleştirir ve geçici etkileşimler yerini kalıcı bağlara bırakır (Stoodley ve ark 2002). Bu aşamadan sonra bakteriler artık yüzeyde geri dönüşümsüz tutunma oluşturmuşlardır. Hücreleri yüzeyden uzaklaştırabilmek için enzim, dezenfektan, deterjan, güçlü mekanik kuvvet (Sinde ve Carballo 2000) veya yüksek ısı işlem gibi çeşitli faktörlere ihtiyaç vardır (Augustin ve ark 2004, Maukonen ve ark 2003, Sinde ve Carballo 2000).

3. Koloni Gelişimi: Bakterilerin yüzeyde birikmesi ve gelişmesi sonucu EPS üretimiyle mikrokoloniler oluşur. EPS bakteri ile alt katman arasında bir nevi köprü görevi görür ve bakteri kolonisini her türlü çevresel etkilere karşı korur (Donlan 2002).

Yüzeyde toplanma işlemi bakterilerin birbirlerine karşı gönderdikleri hücrel sinyal sayesinde meydana gelir. Yüzeyde bir bakteri koloni oluşturduktan sonra aynı yerde diğer bir bakteride koloni oluşturmaya başlayabilmektedir. Biyofilm büyüdükçe polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülebilir (Poulsen 1999).

4. Biyofilm Olgunlaşması: Bu evre bakterilerin ve biyofilm tabakasının pick yaptığı evredir. Besin maddelerinin de etkisiyle gelişen bakteri kolonileri apartman ya da mantar şeklinde koloni haline bürünürler (Chmielewski ve Frank 2003, Klausen ve ark 2003). Besin ulaşımı ve atık uzaklaştırılmasında su kanalları görev görmektedir. Hücrelerin bu hale gelmesi yaklaşık on gün sürmektedir (Stoodley ve ark 2002).

5. Biyofilm Hücrelerinin Ortamdan Ayrılması: Besinlerin artık yetersiz gelmesi sonucu hücreler eski planktonik fazlarına geri dönerler (Sauer ve ark 2002). Akış kuvvetinde artma, EPS yada yüzey bağlanan proteinlerin açığa çıkması, iç enzimatik bozulma gibi sebepler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol oynarlar (Kaplan ve ark 2004). Ayrıca ortamdaki besin maddelerinin tükenmesi de hücrelerin kopmasında rol oynarlar (O'Toole ve Kaplan 2000).

2.3.2. Süt Endüstrisinde Biyofilm

Süt mikroorganizmaların gelişmesi ve büyümesi için oldukça elverişli bir ortama sahiptir. Çok hızlı bir şekilde bozulabilen süt için kontaminasyon sebepleri uygun bir şekilde

temizlenmemiş veya dezenfekte edilmemiş ekipmanlar olabilir (Jessen ve Lammert 2003, Koutzayiotis 1992).

Süt ürünlerinde yaygın olarak görülen bakteriler *Enterobacter* (Salo ve ark 2006), *Listeria* (Waak ve ark 2002), *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* (Sharma ve Anand 2002) ve *Pseudomonas* türleri (Wiedmann ve ark 2000) tespit edilmektedir. Süt ürünlerinin bakteriyel kontaminasyonu ürünün özelliklerine, kalitesine ve güvenliğine etki eder. Boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (Jayaraman ve ark 1997, Poulsen 1999).

Yapılan çalışmalarda birçok bakteri grubunun süt işletmelerinde sağım hattından soğutmaya gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan akan 25 ° C'deki sütte 30 dakika içerisinde tutunabildiği, soğutmadan işletmeye gönderilen sütün geçtiği paslanmaz çelikten yapılmış borulardan geçen 4° C'deki sütte ise 2 saat içerisinde tutunduğunu bildirmiştir. Yine bazı bakterilerin bu sıcaklıkta 20 dakikada yüzeye kolaylıkla tutunabildiği de ifade edilmiştir.

Yapılan bazı araştırmalarda ortamda süt kalıntısı azken bile 6 ° C ve %75,5 nisbi nem şartlarında, 10 gün sonra contalardan ve paslanmaz çelik borulardan *L. monocytogenes* izole edilebilmiştir. Daha fazla kalıntı varlığında ve en uygun olmayan sıcaklık ve nem koşullarında ise en az 3 gün en fazla 5 gün *Listeria monocytogenes* canlılığını sürdürmüştür (Akan ve Kınık 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için 2016 Haziran ayında, Aydın ili ve çevresinde bulunan köylerden 100 inekten süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp, soğuk zinciri kırılmadan Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirildi.

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. Enterococcal Agar (BBL Bile Esculin Agar)

Pancreatic Digest of Gelatin	5 g
Beef Extract	3 g
Oxgall	20 g
Ferric Citrate	0,5 g
Esculin	1 g
Agar	14 g
Distile su	1 lt

Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır.

3.1.2.2 Blood Agar (Merck 1.10886)

Blood Agar	40 g
Distile Su	1000 ml

Karışım yapıldıktan sonra ph 7,2-7,4’e ayarlanıp, on beş dakika otoklavlandıktan sonra, 50°C’ye kadar soğultumuştur. Son olarak içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edilmiştir.

3.1.2.3 Kongo Red Agar (CRA)

BHI broth	37 g
Sakkaroz	36 g
Kongo Kırmızısı	0,8g
Agar	10 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır.

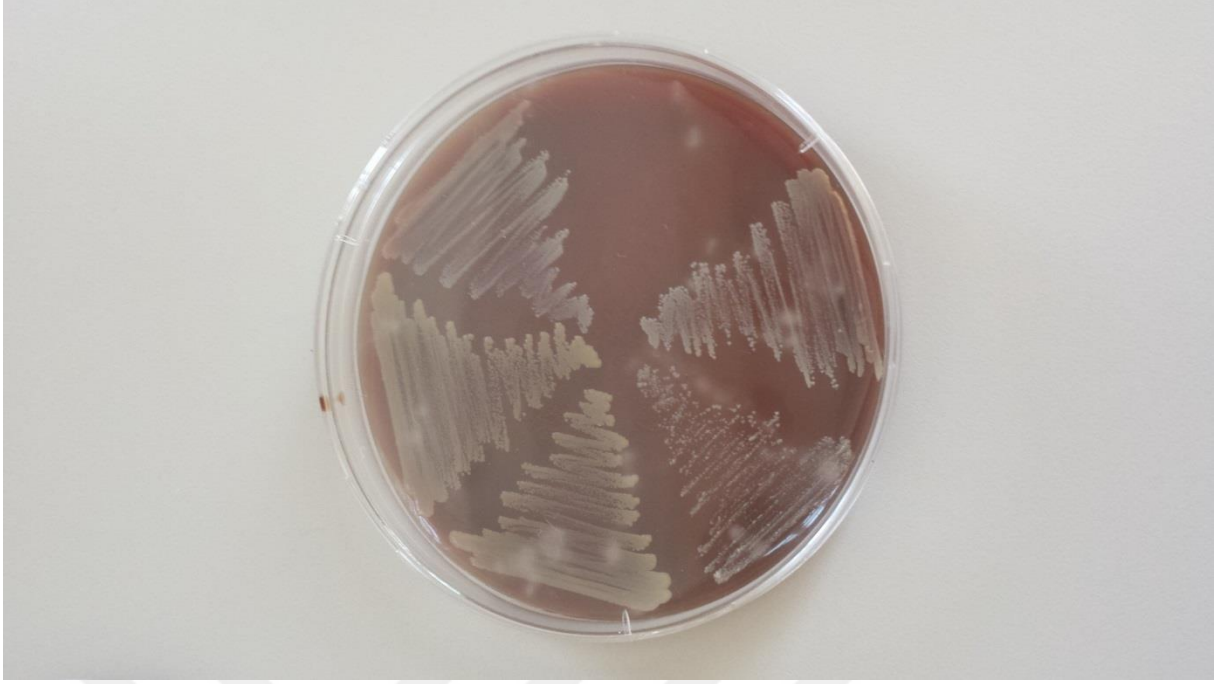
3.2 Yöntem

3.2.1 Örneklerin Alınması

Süt Örnekleri alınırken, dışkı ve çamur bulaşıklı meme başları ıslak mendil ile temizlendi ve daha sonra %70’lik etil alkol emdirilmiş pamuk ile meme başları silindi, her meme başı için ayrı alkollü pamuk kullanıldı. İlk bir kaç çekimlik süt dışarıya atıldıktan sonra süt örnekleri steril cam tüplere alındı.

3.2.2 *Enterococcus* Şüpheli Örneklerinin Belirlenmesi

Laboratuvara getirilen örneklerin Enterococcal Agar (EA) ekimi yapılarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda siyah koloni oluşturarak varlığından şüphelendiğimiz Enterokokların yapıları incelenerek Gram boyaması yapıldı. Gram pozitif olan koloniler saflaştırılmak üzere kanlı agara ekildi.



Resim 2. Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış Gram pozitif koloniler

3.2.2.1. Katalaz Testi

Saflaştırılmış gram pozitif kolonilerden steril öze ile alınıp numune temiz bir lam üzerine aktarıldı. Daha sonra üzerine 1-2 damla %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenir. Bu nedenle test sonucu kabarcıkların meydana gelmediği Katalaz negatif örnekler değerlendirmeye alındı.

3.3. İzolasyonun PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

3.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Enterokokların cins düzeyinde identifikasyonu amacıyla PCR gerçekleştirilmiştir (Ke et al 1999).

Tüm PCR çalışmaları için DNA ekstraksiyonu, kaynatma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla BHI agarda üretilen bakterilerden bir öze dolusu alınmış ve

500 mikrolitre steril distile su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon 100°C’de su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Sonrasında 10.000 g’de 10 dk santrifüj edilmiş ve supernatant alınmıştır. Alınan supernatant PCR işlemlerinde hedef DNA olarak kullanılmıştır.

Toplam 25 µl PCR miksine; 5 mikrolitre hedef DNA, 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 50 pm her bir primer, 0,2 mM her bir dNTP, 1 U of Taq polimeraz ilave edilmiştir. Amplifikasyon koşulları 95°C’de 3 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 95°C’de 30 sn, 55°C’de 30 sn, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %2,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülenmiştir. Elektroforez sonucunda 112 bp lik bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

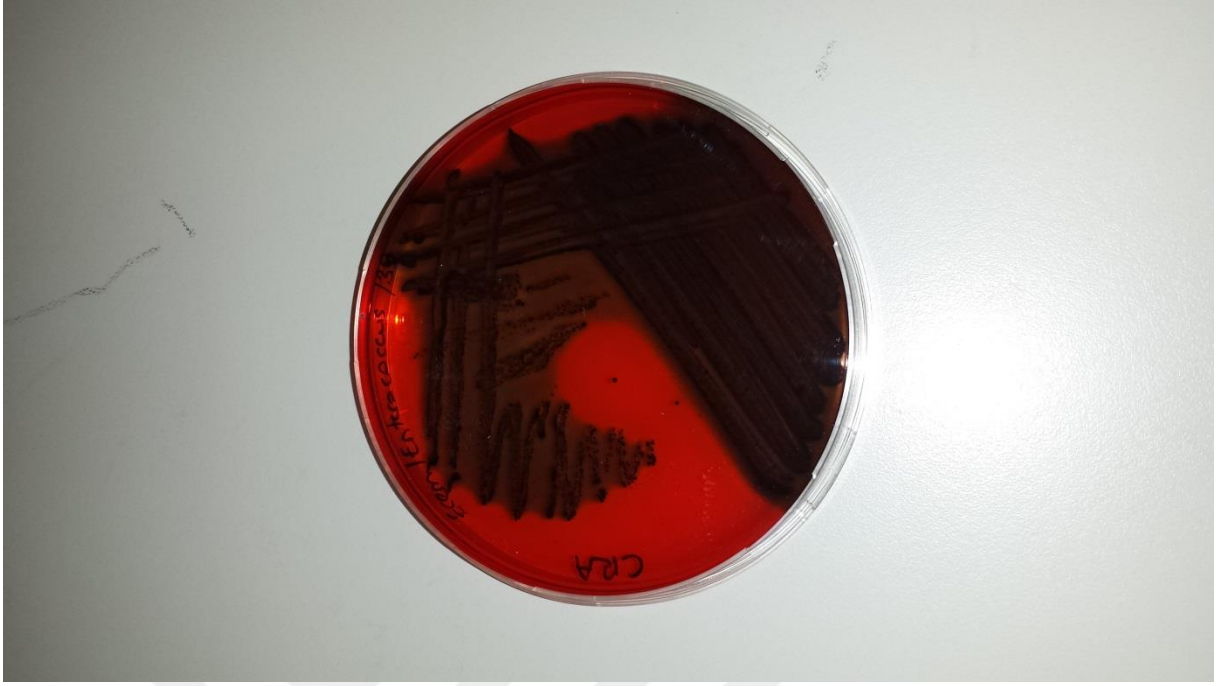
3.3.2. Primerler

<i>Enterococcus spp.</i>	F	5’- TACTGACAAACCATTC ATGATG-3’	112	Ke ve ark. (1999)
	R	5’- AACTTCGTCACCAACG CGAAC-3’		
<i>E. faecalis</i>	F	ACTTATGTGACTAACT TAACC	360	Jackson ve ark. (2004)
	R	TAATGGTGAATCTTGG TTTGG		
<i>E. faecium</i>	F	ACTTATGTGACTAACT TAACC	215	Jackson ve ark. (2004)
	R	TAATGGTGAATCTTGG TTTGG		

3.4. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

3.4.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Slime oluşumu Kongo Red Agar (CRA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Daha sonra slime araştırılacak suşların besiyerlerine ekimi yapıldı. 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu siyah ve pürüzlü yüzey oluşturan örnekler slime pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 3. Kongo red agara ekim yapılan örneklerin inkübasyon sonrası slime görünümü

4. BULGULAR

4.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırma için Aydın ili ve köylerindeki farklı ırktan ve yaştan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilerek incelendi.

Besi yerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 37⁰C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Enterokok şüpheli kolonilerin identifikasyonu için öncelikle gram boyama testi yapıldı. Gram pozitif kok olarak değerlerilen suşlar kanlı agara ekildi ve inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilere katalaz testi yapıldı ve katalaz negatif suşlar saflaştırıldı. PCR işlemi gerçekleştirilen suşlar biyofilm görüntülemesi için kongo red agara ekildi.

Tablo 4. Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdentifikasyon Bulguları

Toplanan Süt Örneği	Gram Pozitif Kok	Katalaz Negatif
100	25	9

Çalışma için toplanan 100 örneğin besi yerlerine ekimi yapıldıktan sonra 25 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlemlenmiştir. Üreme gerçekleştiren 25 örneğe gram boyama uygulanmış ve tamamının Gram pozitif olduğu tespit edilmiştir. Gram pozitif suşlara katalaz testi uygulanmış ve 9 tanesinin Katalaz negatif olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. PCR Bulguları

E. faecium ve *E. faecalis*’in PCR ile identifikasyonu için Jackson ve ark. (2004)’nın kullandıkları protokol ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Toplam 25 µl PCR mikisine; 5 mikrolitre ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 1 mM her bir primer, 0,2 mM her bir dNTP, 2 U of Taq polimeraz ilave edilmiştir. Amplifikasyon koşulları 95°C’de 4 dk ilk denatürasyon, 35 siklus 95°C’de 30 sn, 55°C’de 1 dk, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid

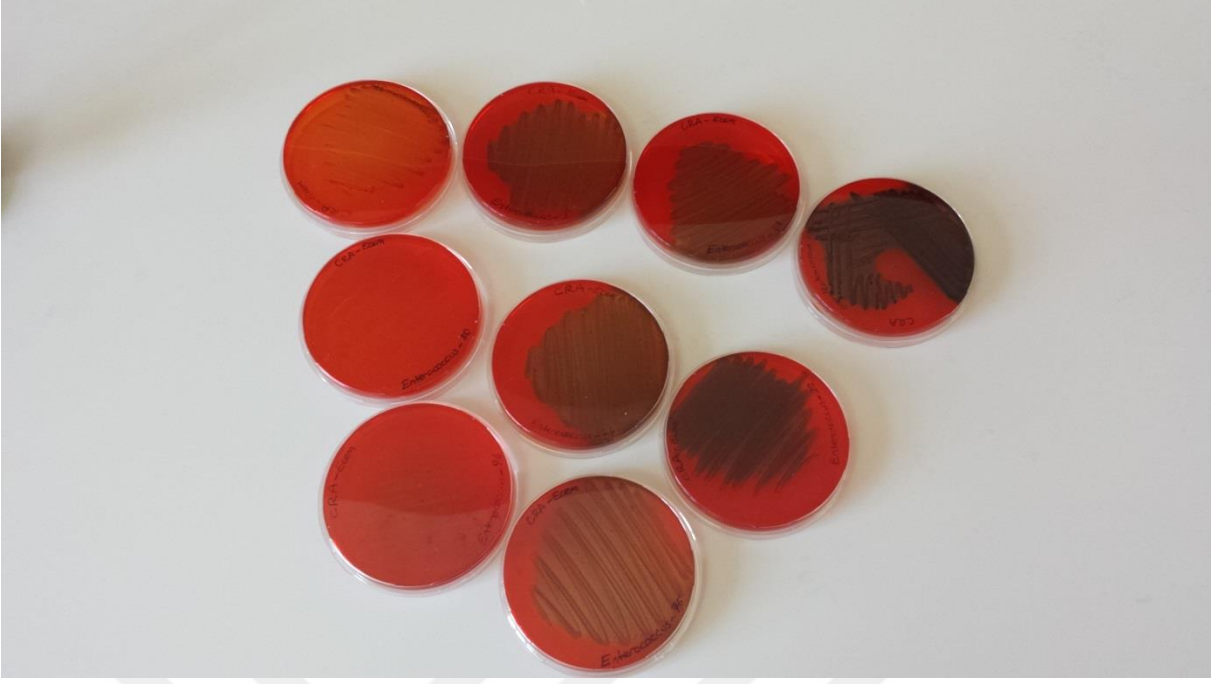
(2µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülenmiştir. Elektroforez sonucunda 360 bp lik bant görülmesi *E. faecalis* ve 215 bp lik bant görülmesi de *E. faecium* için pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.3. Sonuçlar

ÖRNEKLER	SPP	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
1	+	+	—
2	+	+	—
3	+	+	—
4	+	+	—
5	+	+	—
6	+	+	—
7	+	+	—
8	+	—	+
9	+	—	—

4.4 Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

Çalışılan suşların biyofilm oluşturma durumları Kongo kırmızılı agar ile araştırılmıştır. Kongo kırmızılı agar besiyerine ekilen kültürlerin 37°C'de 24 saat inkübasyonundan sonra kırmızımsı-siyah, pürüzlü ve kuru koloni oluşturanlar biyofilm pozitif, pembemsi-kırmızı ve düz koloni yapanlar gram negatif olarak kabul edildi. 9 örneğin 6'sında (% 66,6) biyofilm oluşumu gözlemlenirken 3'ünde (%33,3) biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir.



Resim 4. Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği bakımından kongo red agarda incelenmesi

5. TARTIŞMA

Mastitis vakalarından 130'dan fazla farklı etiyolojik ajanın izole edildiği ve enfeksiyona daha çok bakteriyel etkenlerin neden olduğu bildirilmektedir. Bulaşıcı ve çevresel kaynaklı olarak gruplanan bu bakteriyel patojenler arasında stafilokoklar, streptokoklar ve başta *Escherichia coli* olmak üzere enterobakteriler daha sık izole edilmektedir. Bununla beraber, maya ve küf izolasyonları da gerçekleşmektedir. Ülkemizde mastitis üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen halen süt sığırı yetiştiriciliğinde görülmektedir.

Mastitis tedavisinde antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımı, dirençli suşların gelişmesine yol açmaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal direncin ve virulens faktörlerinin konjugasyonla bir diğer bakteriye transferi, patojenik suşların ortaya çıkmasına ve yayılmasına katkıda bulunarak problemin büyümesine neden olmaktadır. Mastitis, süt sığırcılığı işletmelerinin en önemli problemlerinden biridir. Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, süt veriminde azalma, tedavi masrafları ve yüksek verimli hayvanların sürüden ayıklanması gibi nedenlerle ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Ülkemizde mastitisten kaynaklanan ekonomik kaybın yılda yaklaşık 57,7 milyon TL olduğu tahmin edilmektedir. Memede makroskobik bir yangının ve sütte gözle görülebilir bir değişikliğin olmadığı subklinik mastitis olguları, klinik mastitislere göre daha yaygındır ve mastitise bağlı süt kayıplarının yaklaşık %70- 80'i subklinik mastitisten kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada, inek sütlerinden izole ve identifiye edilen Enterokokların biyofilm üretim yetenekleri araştırıldı.

Jamal A. Mohamed ve David B. Huang (2007) Enterokokların biyofilm üretimini etkileyen faktörleri araştırmışlar ve glukoz takviyesinin (özellikle *E. faecalis*'de) biyofilm üretimini arttırdığını görmüşlerdir.

Yine aynı çalışmada Esp geninin biyofilm üretimindeki rolü araştırılmış ve sahip olmayanların biyofilm üretiminin daha az olduğu tespit edilmiştir.

Biyofilm üretimini etkileyen çalışmada diğer bir etken Jelatinaz olarak değerlendirilmiştir. Yaptıkları çalışmada Jelatinazın biyofilm destekleyici olduğu ortaya konulmuştur.

Yine Jamal A. Mohamed ve David B. Huang (2007) fsr lokusunun biyofilm üretimindeki rolü araştırılmış ve bu lokusa sahip genlerin olduğu bakterilerde biyofilm

üretiminin %28-%35 azaldığı tespit edilmiştir. bee lokusu biyofilm güçlendirici, atn geni otolizindir. Bunun yanında dltA, bop, etaR, gele, salA, salB, srtC gibi genlerinde biyofilm üretiminde rol üstlendikleri araştırılmıştır.

Christopher J. Kristich ve ark (2003) biyofilm üretiminde Esp geninin rolünü çalışmışlar ve bu gene sahip olmayan bakterilere bile bu gen aktarıldığında biyofilm üretiminin azaldığı görülmüştür.

Samantha Yiling Quah ve ark (2012) diş üzerine bir araştırması olmuş olup Enterokoklardaki biyofilm üretiminde N-Acetylcysteine (NAC) etkisini çalışmışlar ve dentin varlığından dolayı bakterinin bundan etkilenmediğini savunmuşlardır.

S. V. Van der Waal ve ark (2011) yüksek ozmoz ve ph'da Enterokokların biyofilm üretimin yeteneğini çalışmışlardır. 72 saatte yüksek ozmozlu ortamda koloni oluşturan birim sayısında azalma meydana gelmiş olup bu durumun aynı zamanda biyofilm üretiminde de negatif sonuçlara sebebiyet verdiğini araştırmışlardır. Aynı şekilde yüksek ph'da bakteriyel üreme de önemli bir azalma yaratmıştır.

Örneklerimizden 25 tanesi Enterococcal agarda üreme göstermiştir. Bu 25 örneğe uygulanan Katalaz testi sonucu 9 tanesi Katalaz negatif olarak sonuçlanmıştır. Örneklerimiz daha sonra kongo red agara ekilerek biyofilm üretim yetenekleri gözlemlenmiştir. Besiyerine ekilen 9 adet örnekten 6 (% 66,6) tanesi biyofilm pozitif çıkmıştır. Geri kalan 3 tanesi (% 33,3) biyofilm bakımından negatif olarak sonuçlandırılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Matitis, süt verimini ve kalitesini olumsuz etkileyen, sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir meme dokusu hastalığıdır. Enterokoklar, biyofilm yapısına katılan çeşitli virulens faktörler sayesinde insanları ve evcil hayvanları enfekte ederler. Enterokok türlerinin çoğu en az bir antibiyotiğe karşı dirençlidir ve biyofilm yapısının bu dirence katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan bu türlerde meydana gelen yüksek dirençliliğin insan sağlığı için de risk teşkil edebileceği düşünülmektedir.

Çalışılan örneklerin 6 tanesi (% 66,6) biyofilm üretme yeteneği gösterirken geri kalan 3'ü (% 33,3) biyofilm üretimi bakımından negatif sonuç vermiştir. Örneklerin 7 tanesi (%77,7) *Enterococcus faecalis*, 1 tanesi (% 11,1) *Enterococcus faecium* olarak PCR'da saptanmış olup 1 tanesinin bu iki türe ait olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Enterokokların sığır yetiştiriciliğinde biyofilm üretimi bakımından önemli bir yere sahip olduğunu gözlemlendi. Bütün bu sebepler sığırcılıkta fazla ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Biyofilm oluşturan bu türlerde meydana gelen yüksek dirençlilik insan sağlığı için de risk teşkil etmektedir. Bu nedenle konu ile ilgili olarak daha detaylı araştırma ve denemelerin yapılması ve önlemlerin alınması gerekliliği ortaya konulmuştur.

KAYNAKÇA

Adolfo Dr. de la Pena Llerandi Enterococcus <http://enterococos.blogspot.com.tr/> (2007)

Akan E., Kınık Ö. Gıda ve Yem Bilimi- Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology 14:46-51 (2014)

Augustin, Mona, Ali-Vehmas, Terhi, & Atroshi, Faik. University of Helsinki Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 7(1), 55-64. (2004).

Akdemir Yusuf Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnç Profilinin Saptanması ,Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi (2010)

Aksu F., Ünver A., Uran H. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumuna bağlı riskler. 7. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı Syf:105. (2011).

Altınsoy N. Mastitis <http://nihanaltinsoy.tr.gg/Mastitis.htm> (2008)

Borucki, M. K., Peppin, J. D and White, D. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 69(12), 7336-7342, (2003).

Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities.Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2(1), 22-32.(2003).

Çaphan İ. <https://biyoinformatik.wordpress.com/2007/02/21/pcr-polimeraze-chain-reaction-nedir/> (2007).

Christopher J. Kristich, Yung-Hua Li, Dennis G. Cvitkovitch and Garry M. Dunny Journal of Bacteriology 186(1): 154-163 Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis* (2004)

Deveci Hüseyin, Timurkan H., Özcan C., Apaydın A. İneklerde Klinik Mastitislerin Alfasilin İle Tedavisi Üzerine Çalışma, Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi 1.Sayı (sf:81-86) (1985)

Dıanı Maryam, Mohammad Nima Ariafar, Nefise Akçelik , Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Turk Hij Den Biyol Derg İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Risk Oluşturan Enterokokal Biyofilm Yapısının Doğası 73(1): 71-80 |DOI: 10.5505/TurkHijyen.2016.48802 (2016).

Dizbay Yaşar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gram Pozitif Bakterilerde İdentifikasyon Algoritması (2012)

Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890, Centers for Disease Control and Prevention. (2002).

Gün İ., Ekinci F. Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda* 34 (3): 165-173 (2009)

Gürgeç Yaşar Çukurova Üniversitesi. Mastitis (Meme İltihabı) Tarımsal Yayın, Arş. ve Uyg. Merk. Çiftçi Broşürü Sayı 6 (2005)

Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J Clin Microbiol*, 42(8), 3558-65. (2004)

Jamal A. Mohamed ve David B. Huang Journal of Medical Microbiology Biofilm formation by Enterococci Pages 1581-1588 (2007)

Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 18: 396–401.(1997).

Jessen, B.,& Lammert, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265-269.(2003).

Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.(2004).

Katie Fisher and Carol Phillips University of Northampton, School of Health The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* 155 (Pt6):1749-57 (2009).

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J Clin Microbiol*. 37: 3497-3503.(1999).

Keskin, G. Al-ke İlaç Ar-Ge Laboratuvarları http://www.alkenet.com/Alke_Mastitis_Genel_Bilgi (2011)

Konrad J. Doming, Helmut K. Mayer, Wolfgang Kneifel *International Journal of Food Microbiology* Enterococci in Foods Pages 147-164 (2003)

Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456 – 2461. (2006).

MicrobeWiki <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus> (2011)

O'Toole, G. A.,& Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.(1998).

Ölmez, Z. Süt sanayisinde biyofilm Oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta. (2009).

Özlüer Abdurrahman Bir Sür Sığırcılığı İşletmesinde Gözden Geçirilmesi Gereken Başlıca Kontrol Noktaları
<http://www.rumida.com.tr/Sayfa.php?Git=Bilimsel&Sayfa=gorus&id=8&baslik=bir-sut-sigirciligi-isletmesinde-gozden-gecirilmesi-gereken-baslica-kontrol-noktaları-1&seo=> (2010)

Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. Lebensm. Wiss. u. Techn., 32 (6): 321-326(1999).

Saiki, K.R, Genlfand, H.D, Stoffi, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G. Primerdirected Enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, (158); 1154-1157. (1988)

Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., & Wirtanen, G. Microbial surveys in-Estonian dairies. LWT - Food Science and Technology, 39(5), 460-471. (2006)

Samantha Yiling Quah, Siwen Wu, Jeen Nee Lui, Chee Peng Sum, Kai Soo Tan Journal of Endodontics National University of Singapore, Faculty of Dentistry N-Acetylcysteine Inhibits Growth and Eradicates Biofilm of *Enterococcus faecalis* Pages 81–85 (2012)

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Bacteriology, 184(4), 1140-1154. (2002)

Savaşan S, Kaya O. Sığır mastitislerinde Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin filtrasyon-boyama yöntemi ile çabuk tanısı, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 29-34. (2004)

Sharma, M. & Anand, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. Food Microbiology, 19, 627-636. (2002).

Sinde, E.,& Carballo, J. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology, 17, 439-447.(2000).

Srey, O., Kabir, I., Ha, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control, 31, 572-585. (2013)

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology, 56, 187-209 (2002).

S. V. Van der Waal, Lwm Van der Sluis, Ar Özok, Ram Exterkate, J. Van Marle, PR Wesselink, JJ De Soet International Endodontic Journal. The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro study, 1110-1117 (2011).

Tok Necla Çiçekler Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi Enterokoklarda Vankomisin Direnci (2006)

Ural O. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Nozokomiyal Enterokok Bakteriyemisi http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu_folder/1998-04/html/1998-2-4-217-223.htm (1998)

Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. Applied and Environmental Microbiology, 66(5), 2085-2095 (2000).

Waak, E., Tham, W., & Danielsson-Tham, M.-L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. Applied and Environmental Microbiology, 68(7), 3366-3370 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Maltaş Ecem
Uyruk : T.C. Vatandaşı
Doğum yeri ve tarihi : Salihli/Manisa 28.05.1991
Telefon : 0 (554) 961 74 15
E-mail : ecem.maltas@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji	2013

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-Halen	Aydın / A101 Aydın Bölge Müdürlüğü	Kalite Kontrol Sorumlusu