



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANIM POTANSİYELİ OLAN
ENTEROCOCCUS CİNSİ BAKTERİLERİN GÜVENİLİRLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Orhan ORUÇ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2019



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANIM POTANSİYELİ OLAN
ENTEROCOCCUS CİNSİ BAKTERİLERİN GÜVENİLİRLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Orhan ORUÇ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2019

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 172330403 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, **Orhan ORUÇ** tarafından hazırlanan “ **PROBİYOTİK OLARAK KULLANIM POTANSİYELİ OLAN ENTEROCOCCUS CİNSİ BAKTERİLERİN GÜVENİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ** ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

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

[Signature]

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Gazi Üniversitesi

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

[Signature]

Üye: Doç. Dr. Hüseyin POLAT

Aksaray Üniversitesi

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

[Signature]

Tez Savunma Tarihi: 09/08/2019

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

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS
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, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini 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.



İmza

Orhan ORUÇ

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasındabilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla bana daima yol gösteren ve destek olan, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan danışman Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a ve yine önemli deneyimleri ile her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine teşekkür ederim.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Orhan ÇETİN'e, Nurseda AHLATCI'ya ve Alihan TOKSOY'a ve desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2017-18 kodlu adlı araştırma projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	i
DOĞRULUK BEYANI.....	Error! Bookmark not defined.
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Probiyotikler	4
2.1.1 Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler	4
2.1.2 Probiyotiklerin mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri.....	5
2.1.3 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	6
2.2 Enterokoklar	7
2.2.1 Enterokokların genel özellikleri	7
2.2.2 Enterokokların insanların normal florasındaki etkileri	8
2.2.3 Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar	9
2.2.3.1 Endokardit.....	9
2.2.3.2 Bakteriyemi.....	10
2.2.3.3 Üriner sistem enfeksiyonları	10
2.2.3.4 Karın içi ve pelviks doku enfeksiyonları	10
2.2.3.5 Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	11
2.2.3.6 Yaygın olmayan enfeksiyonlar	11
2.2.4 Enterokokların probiyotik olarak önemi	11
2.2.5 Enterokokların probiyotik olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar ..	12
2.2.6 Enterokokların probiyotik olarak güvenilirliği	13
2.2.6.1 Enterokoklarda antibiyotik dirençliliği	14
2.2.6.2 Enterokoklarda bulunan virülans faktörler	16
2.2.6.3 Enterokoklarda biyofilm oluşumu	19
3.MATERYAL ve METOT.....	21
3.1 Materyaller	21
3.1.1 Materyal örnekleri	21
3.1.2 Araştırmada kullanılan besiyerleri	22
3.1.3 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	25
3.1.4 Test bakterileri	25
3.1.5 Antibiyotikler	26
3.1.6 Primerler.....	26
3.2 Metot	27
3.2.1 Bakterilerin muhafazası	27
3.2.2 Enterokokların hemolizin aktivitesinin belirlenmesi	28
3.2.3 Enterokokların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	28
3.2.4 Enterokokların jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi.....	29
3.2.5 Enterokokların biyofilm aktivitesinin belirlenmesi	29
3.2.6 Genomik DNA izolasyonu.....	31
3.2.7 Virülans ve direnç genlerinin belirlenmesi	31
3.2.7.1 Vankomisin direnç genleri (vanA ve vanB)	31

3.2.7.2 Sitolizin genleri, jelatinaz, enterokokkal yüzey proteini, hücre agregasyon ve konjugasyon, <i>E. faecalis</i> yüzey antijeni, <i>E. faecium</i> yüzey antijeni, seks feromon determinantları (<i>cylA</i> , <i>cylB</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>efaAfs</i> , <i>efaAfm</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i>).....	32
3.2.7.3 Agregasyon faktörü ve hiyaluronidaz (<i>asa1</i> ve <i>hyl</i>).....	34
3.2.8 DNA dizi analizi	35
3.2.9 Plazmid DNA izolasyonu.....	36
3.2.10 İstatistiksel analiz	38
4. DENEYSEL BULGULAR	37
4.1 Enterokokların Hemolizin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
4.2 Enterokokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	37
4.3 Enterokokların Jelatinaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	40
4.4 Enterokokların Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	42
4.5 Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	44
4.5.1 Vankomisin direnç genlerinin (<i>vanA</i> ve <i>vanB</i>) belirlenmesi	44
4.5.2 Virülans genlerin belirlenmesi	46
4.5.2.1 Sitolizin genlerinin (<i>cylA</i> , <i>cylB</i>) belirlenmesi	46
4.5.2.2 Jelatinaz geninin (<i>gelE</i>) belirlenmesi.....	48
4.5.2.3 Enterokokkal yüzey proteini (<i>esp</i>) geninin belirlenmesi	50
4.5.2.4 Hücre agregasyon ve konjugasyon (<i>agg</i>) ile agregasyon faktörü (<i>asa1</i>) genlerinin belirlenmesi	51
4.5.2.5 <i>E. faecalis</i> yüzey antijeni (<i>efaAfs</i>) ve <i>E. faecium</i> yüzey antijenin (<i>efaAfm</i>) genlerinin belirlenmesi	53
4.5.2.6 Seks feromon determinantlarının (<i>cob</i> , <i>ccf</i>) genlerinin belirlenmesi	55
4.5.2 Hiyaluronidaz (<i>hyl</i>) geninin belirlenmesi	57
4.6 DNA Dizi Analizi.....	60
4.7 Plazmid DNA İzolasyonu.....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	64
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	89

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROBİYOTİK OLARAK KULLANIM POTANSİYELİ OLAN *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİN GÜVENİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Orhan ORUÇ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ÖZET

Tüketilen beyaz peynirler, probiyotik potansiyeli olan enterokoklar da dahil olmak üzere sürekli laktik asit bakterileri sağlarlar. Bu çalışmada, geleneksel beyaz peynirlerden izole edilen 12 *Enterococcus faecalis* suşlarının ve 8 *Enterococcus faecium* suşlarının potansiyel probiyotik kullanımı için sitolizin üretim yeteneği, jelatinaz üretim yeteneği, biyofilm oluşturma yeteneği ve seçilen 10 antibiyotiğe duyarlılığı araştırılmıştır. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının sitolizin üretimleri kanlı agar, jelatinaz üretimi nutrient jelatin besiyeri, biyofilm üretimi 96 kuyucuklu plate yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve antibiyotiklere duyarlılığıda agar disk difüzyon metodu ile test edilmiştir. Vankomisin direnç genleri (*vanA* ve *vanB*) ve sitolizin (*cylA* ve *cylB*), jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), hücre agregasyon ve konjugasyon (*agg*), agregasyon faktörü (*asa1*), *E. faecalis* antijen A proteini (*EfaAfs*), *E. faecium* antijen A proteini (*EfaAfm*), seks feromonları (*cob* ve *ccf*) ve hiyalüronidaz (*hly*) gibi virülens faktörlere ait genler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiştir. Ayrıca direnç ve virülens genlerin varlığı sekans analizleri ile doğrulanmıştır. Bazı direnç ve virülens genlerin plazmid aracılığıyla aktarılabilme olasılığından dolayı bakterilerde plazmid DNA'nın varlığı kontrol edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları çalışmada kullanılan çoğu antibiyotiğe duyarlılık, Polimiksin antibiyotikğine ise dirençlilik göstermiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları, tam sitolizin aktivitesi göstermemiştir. *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21, RT 84 suşları jelatinaz ve RI 11, RI 17, RI 21, RT 102 suşları biyofilm aktiviteleri göstermiştir. Virülens ve direnç genleri bulunma oranı bakımından farklılık göstermiştir. Suşların tamamında, *ccf* (% 100) ve *asa1* (% 100) genleri ve % 5' inde ise *cylA* geni belirlenmiştir. Çalışılan suşlarda *efaAfm* ve *cylB* genleri tespit edilmemiştir. En fazla virülens ve direnç genlerini sahip suş *E. faecalis* RI 6 iken; en az gene sahip suş *E. faecalis* RT 98 olarak bulunmuştur. Plazmid DNA varlığının taranması için yapılan çalışmada *E. faecium* RI 56, RI 58 ve RI 59 suşlarının plazmid DNA tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının fonksiyonel ve güvenlik perspektifleri açısından özellikleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Probiyotik, Biyogüvenlik, Virülens gen

Temmuz, 2019; 89 sayfa

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF THE SAFETY OF *ENTEROCOCCUS* SPECIES BACTERIA THAT USE POTENTIAL AS PROBIOTIC

Orhan ORUÇ

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ABSTRACT

Consumed white cheeses are a continuous supply of lactic acid bacteria, including enterococci with probiotic potentials. In this study, to use potential probiotic of twelve *Enterococcus faecalis* strains and eight *Enterococcus faecium* strains which is isolated from traditional white cheese, it is researched their production capability of cytolysin, production capability of gelatinase, capability of forming biofilm and sensitivity against ten antibiotic determined. *E. faecalis* and *E. faecium* strains were determined of cytolysin production by using blood agar, gelatinase production by nutrient gelatin medium, biofilm production by using 96 well plate method and susceptibility to antibiotics were tested by agar disc diffusion method. Vancomycin resistance genes (*vanA* and *vanB*) and virulence factors genes like cytolysin (*cylA* and *cylB*), enterococcal surface protein (*esp*), cell aggregation and conjugation (*agg*), aggregation factor (*asa1*), *E. faecalis* antigen A protein (*EfaAfs*), *E. faecium* antigen A protein (*EfaAfm*), sex pheromones (*cob* and *ccf*) and hyaluronidase (*hly*) are determined by polymerase chain reaction (PCR). In addition, the presence of resistance and virulence genes was confirmed by sequence analysis. It is checked existence plasmid DNA in bacteria because of transferable possibility of some resistances and virulence genes by plasmid. *E. faecalis* and *E. faecium* strains are sensitive against many antibiotics which is used in study and have resistance against Polymyxin antibiotic. No complete cytolysin activity was observed for *E. faecalis* and *E. faecium* strains. It is obtained gelatinase activity of *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21, RT 84 strains and biofilm activity of *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21, RT 102 strains. Virulence and resistance genes differed in the rate of presence. In all strains, *ccf* (100%) and *asa1* (100%) genes and 5% of the strains were identified as *clyA* gene. As for *EfaAfm* and *clyB* gene, they could not have been determined in any strain. It is determined that while the strain that has the most virulence and resistance genes is *E. faecalis* RI 6, the strain that has the fewest gene is *E. faecalis* RT 98. Plasmid DNA of *E. faecium* RI 56, RI 58 and RI 59 strains were detected in the study for the presence of plasmid DNA. As a result of this study, the characteristics of *E. faecalis* and *E. faecium* strains were determined in terms of functional and safety perspectives.

Key Words: Probiotic, Biosafety, Virulence gene

July, 2019; 89 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1	Genomik DNA moleküler büyüklük standardı.....	32
Şekil 4.1.	Sitolizin aktivitesi	37
Şekil 4.2.	<i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşların antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.....	40
Şekil 4.3.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97 suşunun antibiyotiklere göstermiş olduğu disk difüzyon sonuçları	40
Şekil 4.4.	Jelatinaz aktivitesi sonuçları	41
Şekil 4.5.	<i>vanA</i> geni jel görüntüsü	45
Şekil 4.6.	<i>van B</i> geni jel görüntüsü	46
Şekil 4.7.	<i>clyA</i> geni jel görüntüsü	47
Şekil 4.9.	<i>gelE</i> geni jel görüntüsü	49
Şekil 4.10.	<i>esp</i> geni jel görüntüsü	51
Şekil 4.11.	<i>agg</i> geni jel görüntüsü	52
Şekil 4.12.	<i>asa1</i> geni jel görüntüsü.....	53
Şekil 4.13.	<i>efaAfs</i> geni jel görüntüsü 20447	54
Şekil 4.14.	<i>efaAfm</i> geni jel görüntüsü 20447	55
Şekil 4.15.	<i>cob</i> geni jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.16.	<i>ccf</i> geni jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.17.	<i>hyl</i> geninin jel görüntüsü	58
Şekil 4.18.	<i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyotik direnç ve virülens genleri (%) bulundurma oranları (referans suşlar hariç).....	58
Şekil 4.19.	<i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşların antibiyotik direnç ve virülens genleri (%) bulundurma oranları (referans suşlar hariç)	59
Şekil 4.20.	<i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının plazmid içerikleri.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar	7
Çizelge 3.1. Araştırma kapsamında kullanılacak suş listesi ve izolasyon kaynakları	21
Çizelge 3.1 (devamı). Araştırma kapsamında kullanılacak suş listesi ve izolasyon kaynakları	22
Çizelge 3.2. Man Rogosa ve Sharpa (MRS) besiyeri	22
Çizelge 3.3. Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri	23
Çizelge 3.4. Nutrient Broth (NB) besiyeri	23
Çizelge 3.6. Koyun Kanlı Agar (Or-Bak)	24
Çizelge 3.7. Nutrient Gelatin besiyeri	24
Çizelge 3.8. Test bakterileri ve temin edildiği kaynak	25
Çizelge 3.9. Antibiyotik diskleri ve etki mekanizmaları	26
Çizelge 3.10. Enterokokal virulans ve direnç faktörlerine ait primer dizileri	27
Çizelge 3.11. <i>vanA</i> ve <i>vanB</i> genlerine ait PZR reaksiyonu	31
Çizelge 3.12. <i>cylA</i> , <i>cylB</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>efaAfs</i> , <i>efaAfm</i> , <i>cob</i> ve <i>ccf</i> genlerine ait PZR reaksiyonu	33
Çizelge 3.13. <i>asa1</i> ve <i>hyl</i> genlerine ait PZR reaksiyonu	35
Çizelge 4.1. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi .	38
Çizelge 4.2. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları	39
Çizelge 4.3. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları	39
Çizelge 4.4. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının jeatinaz testinin sonuçları	41
Çizelge 4.5. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının hücre yoğunlukları ve canlılık oranları	42
Çizelge 4.6. Biyofilm aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan formüller	43
Çizelge 4.7. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşların biyofilm deneyi sonuçları	43
Çizelge 4.8. Vankomisin direnç genleri ile ilgili PZR sonuçları	45
Çizelge 4.9. Sitolizin genleri PZR sonuçları	47
Çizelge 4.10. Jelatinaz geni PZR sonuçları	49
Çizelge 4.11. Enterokokal yüzey proteini (<i>Esp</i>) gen bölgesi ile yapılan PZR sonuçları	50
Çizelge 4.12. Hücre agregasyon ve konjugasyon geniyle ilgili yapılan PZR sonuçları	52
Çizelge 4.13. Enterokokal yüzey antijenleri PZR sonuçları	54
Çizelge 4.14. Seks feromon determinantları PZR sonuçları	56
Çizelge 4.15. Hiyaluronidaz geninin PZR sonuçları	57
Çizelge 4.15 (devamı). Hiyaluronidaz geninin PZR sonuçları	58
Çizelge 4.16. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının izolasyon kaynakları ile taşıdıkları direnç ve virülens genler	59
Çizelge 4.17. DNA dizi analizi blast sonuçları	60
Çizelge 4.17 (devamı). DNA dizi analizi blast sonuçları	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan tür kültür koleksiyonu
Bç	Baz çifti
Bp	Baz çifti
CLSI	Klinik laboratuvar standartları enstitüsü
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
EfaA	Enterokokal antijen a
EPS	Ekzopolisakkarit
Esp	Enterokokal yüzey proteini
FAO	Gıda ve tarım örgütü
<i>fsr</i>	Fekal streptokok regülatör
GRAS	Genel olarak güvenli bilinen
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipopolisakkarit
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Mono potasyum fosfat
Kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipopolisakkarit
M	Molarite
MgCl₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteaz
MRS	Man rogosa sharpe
Na₂HPO₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NB	Nutrient broth
NCDO	National collection of food bacteria
Ng	Nanogram
Nm	Nanometre
OD	Optik dansite
pH	Asitlik bazlık birimi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	Dakikada devir sayısı
RSKK	Refik saydam hıfzıssıhha merkez başkanlığı kültür koleksiyonu
Sp	Species (türleri)
TAE	Tris asetat EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
TSB	Triptik soy broth
WHO	Dünya sağlık örgütü
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
β	Beta
γ	Gama

1.GİRİŞ

Son yıllarda insan vücudundaki biyolojik fonksiyonları olumlu yönde etkileyen ve hastalık gelişme riskini azaltan gıdaların kullanımı oldukça artmaktadır. Fonsiyonel gıda olarak bilinen bu gıda kategorisi probiyotik mikroorganizmaları da kapsamaktadır (Turkmen vd., 2019). Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında konakçı üzerinde yararlı bir etki sağlayan tek ya da karışık canlı mikroorganizma kültürleridir (FAO/WHO, 2002). Antikanser aktivite, antimutajenik aktivite, antioksidan aktivite gibi yararlı özellikler sağlayan bu mikroorganizmaların çoğunluğunu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* cinsi gibi laktik asit bakterileri oluşturmaktadır (Garssen vd., 2004; Parvez vd., 2006; Gülbandılar vd., 2017).

Genellikle tek, çift ya da zincir oluşturmuş koklar halinde bulunan enterokoklar, Gram pozitif, spor oluşturmayan, oksidaz negatif, katalaz negatif ve fakultatif anaerobik bakterilerdir (Javed vd., 2011). Enterokokların geniş bir habitatta yer almaları, adaptasyon yeteneklerinin yüksek olması, mikrobiyal enzim, bakteriyosin gibi çeşitli metabolitler üreterek gıdaların besin değerini yükseltmeleri ve doğal koruyucu olarak bulunmaları onları probiyotik olarak kullanımı ile ilgili çalışmaların ilgi odağı haline getirmiştir (Franz vd., 2003; Ghrairi vd., 2008; Zhang vd., 2017). Ancak enterokokların probiyotik olarak kullanımı hala tartışmalı bir konudur. Enterokokların sitolizin, agregasyon faktörü, jelatinaz, seks feromonları, enterokokal yüzey adhezinleri ve hiyaluronidaz gibi virülens genler içermesi ve artan glikopeptid dirençlerinin olması onların probiyotik olarak kullanılmasıyla ilgili endişelerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Franz vd., 2003). Enterokokların probiyotik olarak kullanılabilmesi için biyogüvenilirliğinin tam olarak bilinmesi gerekmektedir (Hanchi vd., 2018).

Bu çalışmada, Türkiye ve İran'ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilerek tanımlanmış, antimikrobiyal aktivite, antibiyotik dirençlilikleri, laktik asit üretimi, hidrojen peroksit ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, agregasyon, koagregasyon, yapay mide ve bağırsak sıvısında canlılık ve hidrofobisite gibi probiyotik özellikleri araştırılmış, biyokimyasal özellikleri belirlenmiş ve moleküler tanımlamaları yapılmış 12 *Enterococcus faecalis* ve 8 *Enterococcus faecium* suşları

kullanılmıştır. Birçok probiyotik özellikleri belirlenmiş enterokok kültürlerinin probiyotik olarak güvenli kullanılabilirliğini sağlayabilmek için çalışma kapsamında;

- Enterokokların güvenilir ve sağlıklı olmalarının en önemli göstergesi vankomisin glikopeptitlere duyarlılıklarıdır. Bu nedenle *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının başta vankomisin olmak üzere çeşitli antibiyotiklere dirençliliklerinin ve genlerinin(*vanA*, *vanB*) varlığının belirlenmesi,
- Bakterilerde hemolizin üretimi enfeksiyon ihtimalini arttırdığından dolayı, virülens faktörü sayılmaktadır. β -hemoliz aktivitesi enterokokların patojen olma ihtimalini yükselttiği için arzu edilmeyen bir özelliktir. Bu sebeple bakterilerin hemolizin aktivitelerinin tespit edilmesi,
- Sitolizin (hemolizin/bakteriyosin) sistemi enfeksiyon modellerinde virülensliğe katkı sağlayan ekstraselüler ürünün üretimine yol açtığından bakterilerde sitolizin biyosentezinden sorumlu olan *cylA* ve *cylB* genlerinin varlığının belirlenmesi,
- Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz, matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstraselüler çinko içeren bir üyesidir. Jelatin, kollojen, kazein, hemoglobin, insülin, *E. faecalis* seks feromon-cevap peptitleri ve bazı diğer biyoaktif peptitleri hidrolize edebildiğinden diğer bir salgılanan virülens faktörü olarak jelatinaz aktivitesini kodlayan *gelE* geninin varlığının araştırılması ve jelatinaz aktivitesinin *in vitro* olarak test edilmesi,
- Konak dokulara tutunma enfeksiyon sürecinin en önemli adımıdır. Enterokoklar gibi gastrointestinal sistemde bulunan kommensal canlıların mukozal yüzeyler üzerindeki ökaryotik reseptörlere bağlanmalarını arttıran yüzey adhezinlerinin kolonizasyonda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu amaçla virülans determinantlar arasında biyofilm oluşumu ile bağışıklık sisteminden kaçarak sağ kalıma olanak veren yüzey adhezinleri (*esp*) ve agregasyon faktöründen (*asa1* ve *agg*) sorumlu gen bölgelerinin taranması,

- Patojenitedeki rolü tam olarak açıklanmayan *E. faecalis* antijen A, enterokok hücrelerinin biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunmada ve biyofilm oluşumunda gerekli olduğu tahmin edildiğinden, serum tarafından indüklenebilen bir yüzey proteinini kodlayan *efaAfs* ile son literatürlerde *E. faecium* antijen A olarak tanımlanan *efaAfm* gen bölgelerinin araştırılması,
- Antibiyotik direnç ve sitolizin üretimi gibi virülans özelliklerin yatay gen transferinin, *E. faecalis* ve *E. faecium* seks feromon sistemi ile sağlandığı belirtildiği için seks feromon determinantları olan *cob* ve *ccf* genlerinin tespit edilmesi,
- Hiyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan parçalayıcı bir enzim olan ve kromozomal *hly* geni tarafından kodlanan hiyaluronidaz gen bölgesi belirlenmesi,
- Biyofilm çeşitli canlı cansız yüzeyler üzerine tutunmuş hücre popülasyonudur. Biyofilm içerisindeki organizmalar; besin eksikliği, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi olumsuz koşullara karşı daha dirençlidirler. Biyofilmler birçok hastalığın kaynağı olup ortadan kaldırılması çok zordur. Bu sebepten dolayı biyofilm aktivitesinin *in vitro* olarak belirlenmesi,
- Enterokokların virülansında, genomda bulunan plazmidler de kodlanan virülans genlerinde rol oynadığından bakterilerin plazmid DNA'ları tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Probiyotikler

Son yıllarda gıda tüketicileri ‘fonksiyonel gıdalar’ adı altında bulunan ürünlerle daha fazla tanışmaktadırlar. İnsan vücudundaki biyolojik fonksiyonları olumlu yönde etkilediği, sağlık düzeyini iyi yönde geliştirdiği ve hastalık gelişme riskini azalttığı kesinleşen gıdalar “fonksiyonel gıdalar” olarak bilinmektedirler. Fonksiyonel gıdaların yaklaşık %40’nı fonksiyonel süt ürünleri oluşturmaktadır. Fonksiyonel süt ürünlerinin büyük çoğunluğu kefir, yoğurt gibi probiyotik mikroorganizma içeren fermente ürünlerdir (Turkmen vd., 2019).

‘Probiyotik’ kelimesi Yunanca bir kelime olup ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir (Gomes ve Malcata, 1999). Probiyotik terimi ilk kez 19. yüzyılın başlarında Nobel ödülü sahibi Elie Metchnikoff tarafından ortaya atılmıştır (Sanders, 2003). Probiyotikler yeterli miktarda tüketildiklerinde gastrointestinal sistemde kolonize olarak konak organizmaya yararlı etkiler sağlayan tek veya karışık canlı mikroorganizmalardır (FAO/WHO, 2002).

2.1.1 Probiyotik mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler

Probiyotikler konakçı vücuduna alındığında gastrointestinal sistem yoluyla bağırsağa ulaşarak orada koloni oluşturan ve konakçıya çeşitli yararlı etkiler sağlayan mikroorganizmalardır. Bir mikroorganizmanın konakçı üzerinde canlılığını koruyup probiyotik olarak kabul edilebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir.

Bunlar;

1. Güvenilir olmalıdır. Probiyotik mikroorganizmanın kendisi ya da ürettiği metabolitler konakçı için toksik olmamalıdır.
2. Patojen olmamalıdır. Konakçıya zarar verecek ve konakçada hastalık yapacak hiçbir aktivite sergilememelidir.
3. İnsanlar için kullanılacak olarak suşlar tercihen insan kaynaklı olmalıdır.
4. Vücuda alındıklarında canlılığını koruyarak bağırsağa ulaşabilmesi için mide asidine dirençli olmalı ve safrayı tolere edebilmelidir.

5. Bağırsakta epitel hücrelere tutunarak kolonize olabilmeli ve burada çoğalarak devamlılığını sağlayabilmelidir.

6. Antimikrobiyal maddeler sentezleyerek bağırsakta yaşayan patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite sergilemelidir.

7. Stabil olmalıdır. Olumsuz koşullara karşı dirençli olmalıdır.

8. Konakçıya yarar sağlamalıdır (Salminen, 1998; Gismondo vd., 1999; Gülbandılar vd., 2017).

2.1.2 Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

Probiyotikler insan bağırsak sisteminde bulunarak, burada ürettiği metabolitler sayesinde konakçı sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak olumlu yönde etkileyecek özellikler göstermektedirler.

Bunlar;

1. Probiyotikler, laktik asit gibi organik asitlerin senteziyle bağırsak pH'sını düşürerek (Ogawa vd., 2001), bakteriyosin gibi mikrobiyal proteinler sentezleyerek (Hwanhlem vd., 2017) ve hidrojen peroksit üreterek bağırsakta yaşayan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite sergilemektedirler (Pridmore vd., 2008).

2. Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek; mutajenik, karsinojenik ve genotoksik bileşikleri inaktive ederek ve/veya bağlayarak, epitelyal yüzeyleri stabilize ederek; kısa zincirli yağ asitleri üreterek ve kolondaki fizyokimyasal koşulları değiştirerek antikanserojenik ve antimutajenik etkiye sahiptirler (Rowland, 2009; Serban, 2014).

3. Bazı probiyotik mikroorganizmalar, sahip oldukları β -laktamaz enzim aktivitesi ile özellikle süt tüketimine bağlı olan ve laktozun sindirimindeki bozukluklara bağlı olarak gelişen laktoz intoleransı tedavisinde kullanılmaktadır. *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium longum* ve *L. acidophilus* gibi yoğurta ve süt ürünlerinde bulunan probiyotiklerin laktoz intoleransına bağlı semptomları azalttığı bildirilmiştir (Vonk vd., 2012).

4. Probiyotikler konakçı vücudunda rekabet ortamı oluşturarak ve bağışıklık sistemini geliştirerek, Rotavirus'e bağlı gelişen akut diyare ya da antibiyotik kullanımından dolayı ortaya çıkan diyarenin tedavisinde kullanılmaktadır (Hord, 2008; Sudha ve Bhonagiri, 2012).

5. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktobasil suşları rekabet ortamı oluşturarak ve antimikrobiyal maddeler sentezleyerek gastrit, ülser gibi hastalıklara sebep olan *Helicobacter pylori*'nin çoğalmasını inhibe etmektedir (Reid vd., 2003).

6. Probiyotikler; proinflamatuvar, antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve ekspresyonunu artırılması, apoptozun düzenlenmesi ve daha birçok mekanizma ile konakçının immün fonksiyonunu geliştirerek hastalık, alerji gibi olumsuz şartlara karşı konakçı direncinin artmasını sağlamaktadır (Coşkun, 2006).

7. Probiyotikler serum kolesterol düzeyini düşürerek kalp rahatsızlıklarını önleyebilmektedirler (Yeşilova vd., 2010).

8. Probiyotikler antiobezite, antidiyabetik, antialerjik etki gibi daha pek çok yararlı etkileri bulunmaktadır (Kerry vd., 2018).

Probiyotiklerin, insan sağlığı üzerinde yukarıda belirtilen etkilerin yanı sıra kolonda bulunan bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesine bağlı olarak gelişen rahatsız edici bağırsak sendromunun iyileştirilmesi, vitamin metabolizmasının geliştirilmesi, vajinal mikrobiyotanın düzenlenmesi, ortam pH'sının düşük tutularak patojenlerin inhibe edilemesi ile ürogenital hastalıkların engellenmesi, ve diş çürüklerinin önlenmesi gibi etkileri de bulunmaktadır (Pandey vd., 2015; Gülbandır vd., 2017).

2.1.3 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Geçmişten günümüze kadar probiyotik bakteri suşları, fonksiyonel fermente gıdaların üretiminde, çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak ve bazı hastalılarda tedavi amacıyla kullanılmıştır (Pandey vd., 2015; Turkmen vd., 2019). Probiyotik olarak mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır (Ouwehand vd., 2002; Jan vd., 2002).

Probiyotik mikroorganizmaları oluşturan bakterilerin çoğunluğunu ise *Lactobacillus* sp. ve *Bifidobacterium* sp. suşları oluşturmaktadır. Bunların dışında *Streptococcus* sp. ve *Enterococcus* sp. suşlar, mayalar ve küfler de probiyotik olarak kullanılmaktadır (Garssen vd., 2004 ; Parvez vd., 2006; Kerry vd., 2018; de Melo Pereira vd., 2018) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar.

	Cins	Tür
Laktik asit bakterisi	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. delbrueckii subsp.bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. mesenteriodes</i>
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. adolescentis</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. Salivarius</i> , <i>S. Diacetylactis</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
Diğerleri	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. cerevisiae</i>
	<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. laterosporus</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i>
	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
	<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes amylophilus</i> , <i>B. uniformis</i>

2.2 Enterokoklar

2.2.1 Enterokokların genel özellikleri

İlk ‘*Enterococcus*’ terimi 19. yüzyılın sonunda Thiercelin'in enfeksiyona neden olabilen bağırsak kökenli saprofitik bir kok tanımladığı zaman ortaya çıkmıştır. (Kačániová vd., 2013). Enterokoklar ilk tanımlandıklarında *Streptococcus* (D grup streptococci) cinsi olarak değerlendirilmiş, 1984 yılında enterokoklar ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984). *Enterococcus* cinsi *Enterococcaceae* familyasına aittir (Devriese vd., 2006).

Enterokoklar genellikle tek, çift ya da zincir oluşturmuş koklar halinde bulunmaktadır. Gram pozitif kok olan enterokoklar spor oluşturmazlar, sitokrom enzimleri olmadığı için oksidaz negatifler, katalaz negatif ve fakultatif anaeroblardır. Optimum 35°C’de sıcaklıkta ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında (%6,5'e kadar) gelişebilirler (Javed vd., 2011). enterokokların birçoğu, fenotipik tanımlama özelliklerinden biri olan %40 safra tuzu varlığında eskulini hidrolize edebilir (Araújo ve Ferreira, 2013).

Enterokoklar, glikozu birincil metabolizmanın ana ürünü olan laktik aside (homofermentatif) dönüştürme yeteneklerinden dolayı laktik asit bakterisi (LAB) olarak sınıflandırılırlar (Devriese vd., 2006). Çevre şartlarına dirençli olmaları ve adaptasyon yeteneklerinin yüksek olmasından dolayı enterokoklar; su, toprak, bitkiler, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemleri gibi daha pek çok kaynaktan izole edilebilmektedirler (Franz vd., 2003). Enterokokların *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. mundtii* gibi en çok bilinen türlerinin yanı sıra tanımlanmış yaklaşık olarak 32 türünün olduğu bildirilmiştir (Ogier vd., 2008; Svec vd., 2006). Gıda ve klinik örneklerden en fazla izole edilen türler *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*’dur (Hardie ve Whitley 1997).

Enterokoklar, bakteriyosinler (enterosinler), çeşitli enzimler ve aromatik bileşikler üretirler (Achemchem vd., 2005; Ghairi vd., 2008; Cleveland vd., 2001). Fermente süt ürünleri gibi çeşitli gıdaların lezzetine, aromasına ve güvenliğine katkıda bulunurlar (Sabia vd., 2002; Tanasupawat vd., 2008; Giraffa, 2000). Sütten izole edilen enterokoklar; proteolitik, lipolitik ve sitratın parçalanması aktiviteleri ile geleneksel peynirlerin olgunlaştırılması, duyu özelliklerinin geliştirilmesi, tat ve lezzetlerin oluşması süreçlerinde rol oynarlar (Foulquié Moreno vd., 2006; Morandi vd., 2006; Ogier ve Serron, 2008).

2.2.2 Enterokokların insanların normal florasındaki etkileri

İnsan vücudu özellikle gastrointestinal sistem mikrobiyal topluluklar tarafından kolonize olabilmek için konakçı olarak kullanılmaktadır. İnsan kolonu yaklaşık olarak 10^{12} bakteri içerir ve bakteri mikrobiyotasında baskın olan bakteri konakçı homeostazını olumlu ya da olumsuz yönde etkilerler (Sartor, 2008; Berg, 1996).

Enterokok türleri insanların normal mikrobiyotasından yer alan laktik asit bakterilerindendir. İnsan mikrobiyotasında en çok bulunan enterokok türleri *E. faecium* ve *E. faecalis*'dir (Devriese vd., 1990). İnsan mikrobiyotasında bulunan enterokokların yaklaşık %10'luk bir kısmı kommensal olarak bulunur ve gastrointestinal sistemi, idrar yollarını, kan dolaşımını, endokard, safra yollarını, yanık yaralarını ve kalıcı yabancı cisimleri enfekte eden çok çeşitli hastalıklara neden olabilirler (Jett vd., 1994).

2.2.3 Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar

Enterokoklar özellikle insanların normal gastrointestinal mikrobiyotası olmak üzere ağız boşluğu, genital sistem gibi bir çok yerde kolonize olan mikroorganizmalardır (Moellering, 2005). Enterokoklar düşük virülensli mikroorganizmalar olmalarına karşın toplum kaynaklı ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir (Yıldırım, 2007). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar genellikle konakçı hastadan bağışıklık sistemi zayıflamış hastaya kontamine ekipman, kontamine olmuş ortak kullanım alanları ve hastane personeli aracılığı ile geçmektedir (Arias ve Murray, 2012). Son yıllarda enterokoklara bağlı hastane kaynaklı enfeksiyonların prevalansında ciddi bir artış görülmüştür. Bu artışa vankomisin dirençli enterokokların (VRE) sürekli olarak artması sebep olarak gösterilebilir (Cantón vd., 2010). Enterokokların hastalık oluşturabilmesi için konak hücrelere bağlanarak burada kolonize olabilmeleri gerekmektedir. Konak hücrelerde kolonize olan enterokoklar burada bazı virülens faktörleri üreterek konakta patolojik değişikliklere sebep olurlar. Bu şekilde konakta enterokoklara bağlı enfeksiyonlar oluşmaktadır (Johson vd., 1994).

2.2.3.1 Endokardit

Endokardit, en ciddi enterokok enfeksiyonlarından biridir. Enterokoklar streptokoklar ve *Staphylococcus aureus*'tan sonra endokardit oluşumunda rol alan üçüncü enfeksiyon kaynağıdır. Enterokok, endokardit vakalarının % 5 ila 15'ine neden olmaktadır (Murdoch, vd., 2009). *E. faecalis*, *E. faecium*'dan daha yaygın enterokok endokardit enfeksiyonlarında rol almaktadır.

Bu kalp kapakçığı enfeksiyonları tipik olarak yaşlılarda görülür (Anderson vd., 2004; McDonald vd., 2005). Enterokok endokardit, diğer infektif endokardit formlarına göre daha düşük ölüm oranına sahiptir (McDonald vd., 2005).

2.2.3.2 Bakteriyemi

Enterokok bakteriyemisi, enterokok endokarditinden daha sık görülmektedir (Murray, 1998). Bakteriyemi kaynağı genellikle üriner sistemdir, ancak bakteriyemi ayrıca sıklıkla karın içi veya biliyer kaynaklardan, merkezi çizgilerden veya yumuşak doku enfeksiyonlarından da kaynaklanmaktadır. Enterokok bakteriyemisinden kaynaklanan toplam ölüm oranı % 26 ile % 46 arasındadır (Patterson vd., 1995).

2.2.3.3 Üriner sistem enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları enterokokların yol açtığı klinik hastalıkların en sık görülenidir. Enterokoklar genel olarak üriner sistem enfeksiyonlarında nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır (Moellering, 2005).

Yaşlı erkeklerde alt üriner sistem enfeksiyonları (sistit, prostatit ve epididimit gibi) sık görülür (Graninger ve Ragette, 1992). Bakteriyemi gelişmediği sürece üriner enfeksiyonlarda ölüm oranı oldukça düşüktür (Linden vd., 1996).

2.2.3.4 Karın içi ve pelvik enfeksiyonları

Enterokoklar genellikle karın içi ve pelvik enfeksiyonları kültürlerinde bulunmaktadır. Bu enfeksiyonlara genellikle diğer bakterilerle beraber neden oldukları gibi nadiren bu bölgelerde monomikrobiyal enfeksiyonlarda da görülebilmektedirler (Moellering, 2005). Bu enfeksiyon en sık karaciğer sirozu ile birlikte veya kronik periton diyalizi alan hastalarda görülmektedir. Enterokok, bu durumlarda monomikrobiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Patterson vd., 1995).

2.2.3.5 Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar nadir olarak açık yara ve yumuşak dokularda enfeksiyona sebep olmaktadır. Enterokoklar cerrahi yara enfeksiyonlarında, yanık yaralar enfeksiyonlarında, ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında diğeri fırsatçı patojenlerle birlikte bulunabilmektedir (Moellering, 2005).

2.2.3.6 Yaygın olmayan enfeksiyonlar

Enterokoklar endokardit, bakteriyemi ve üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olabildiğı gibi nadiren de olsa bazı enfeksiyon hastalıklarına da sebep olabilmektedirler. Bunlara menenjit, yeni doğan sepsisi hematojen osteomyelit, septik artrit ve zatürre gibi hastalıklar örnek olarak verilebilir (Herman ve Gerding, 1991; Higuira ve Huycke , 2014).

2.2.4 Enterokokların probiyotik olarak önemi

Laktik asit bakteri cinslerinden biri olan enterokoklar çevre şartlarına oldukça dirençli olan, çeşitli gıdalarda ve insan gastrointestinal sistem florasında doğal olarak bulunan, mikroorganizmalardır. Enterokoklar süt ürünleri, et, balık, deniz ürünleri ve sebzeler gibi çeşitli ticari fermente ürünlerin doğal florasında bulunarak çeşitli metabolitler sentezleyerek onların üretilmesinde ve biyogüvenliğinin korunmasında rol almaktadır (Favaro vd., 2015; Penna vd., 2015; Zommiti vd., 2018). Ayrıca biyoaktif bileşikler ve çeşitli vitaminler üreterek gıdalara tat , aroma ve çeşitli faydalı özellikler katmaktadırlar (Ahmadova vd., 2013; Santos vd., 2015; Amaral vd., 2017).

Enterokoklar çeşitli enzimler, aromatik bileşikler ve bakteriyosin, laktik asit gibi antimikrobiyal maddeler sentezlemelerinden dolayı probiyotik olarak kullanımı ile ilgili çalışmaların ilgi odağı haline getirmiştir. Enterokokların probiyotik olarak kullanımı ile ilgili çalışmalarda genellikle *E. faecium* suşları probiyotik amaçlı olarak en sık kullanılan türdür (Vael ve Goossens, 2002).

2.2.5 Enterokokların probiyotik olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar

Enterokoklar, konak organizma üzerinde gösterdikleri yararlı etkilerinden dolayı probiyotik çalışmalarının ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca enterokoklar; çevresel şartlara dirençli olmaları, birçok habitattan izole edilebilmeleri ve çeşitli metabolitleri sentezleme özellikleri sayesinde potansiyel probiyotiklerle ilgili çalışmalarda daha fazla önem kazanmışlardır.

Saavedra vd., (2003), ev yapımı arjantin peyniri olan “tafi” peynirinden 122 *E. faecium* suşunu izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar, izole edilen enterokok suşlarından dokuz suşun kolesterol düşürücü özelliklerinin olduğunu, altı suşun bakteriyosin üretebildiklerini ve bunların virülens özelliklerinin bulunmadığını tespit ederek probiyotik olarak kullanılabileceklerini bildirmişlerdir.

Enterokoklarla ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, çocuklarda diyarenin önlenmesi ve antibiyotik kullanımına bağlı diyarenin tedavisinde *E. faecium* SF68 suşunun kullanımının çocuklarda hastalığın seyrini olumlu yönde değiştirdiği belirlenmiştir (Franz vd., 2003).

Rahatsız edici bağırsak sendromunun tedavisi için *E. faecium* PR88 suşu kullanılması ile insanlarda bağırsak sendromunu iyileştirdiği görülmüştür (Allen vd.,1996). Fan vd., (2006) yaptıkları çalışmada, *Enterococcus* sp. suşı içeren probiyotik preperatı 85 hasta üzerinde denediklerinde hastalarda iyileşme olduğunu gözlemlemişlerdir.

Anne sütünden izole edilen *E. faecium* 2C ile beslenen deney hayvanlarının, sağlığı üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığını ve fonksiyonel gıda üretiminde güvenli probiyotik suş olarak kullanılabileceğini belirlenmiştir (Khalkhali ve Mojgani, 2018).

Deney hayvanları ile yapılan başka bir çalışmada, probiyotik *E. faecium* NCIMB 10415 suşunun domuz yavrularında, enterotoksijenik *Escherichia coli* inflamasyonu üzerinde etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda probiyotik *E. faecium* NCIMB 10415 suşunun hiçbir toksik etki göstermediğini, inflamasyonu önlendiği ve *Escherichia coli*’nin dokulara verdiği zararında iyileştirildiği tespit edilmiştir (Kern vd., 2017).

Probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkisine bakmak için yapılan plasebo kontrollü çalışmada, probiyotik *E. faecium* M-74 suşu kapsül içinde 46 gönüllü insana verilmiştir. 50 haftalık tedaviden sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, probiyotik kullanımının hastalarda düşük yoğunluklu lipopolisakkarit (LDL) kolesterolü düşürdüğü, yüksek yoğunluklu lipopolisakkarit (HDL) kolesterol ve trigliserit oranını etkilemediği belirlenmiştir (Hlivak vd., 2005). *E. faecium* WEFA23 suşunun da kolesterol düşürücü etkisi olduğu ve metabolik sendromun iyileşmesinde probiyotik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2017).

Enterococcus’lardan elde edilen bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanıldığında herhangi bir olumsuz etkisi bildirilmemiştir (Franz vd., 2001; Fernandez vd., 2007). Ayrıca *E. faecium* K77 suşunun, Danimarka’da ticari olarak bulunabilen ve starter kültür olarak kullanımı önerilen probiyotik olduğu bildirilmiştir (Giraffa, 2003; Ross vd., 2002).

2.2.6 Enterokokların probiyotik olarak güvenilirliği

Laktik asit bakterilerinin önemli bir üyesi olan enterokoklar bir çok gıdada doğal olarak bulunmakta, gıdaların fermentasyonunda ve olgunlaşmasında rol almaktadırlar. Enterokokların çevresel direnç sahibi olmaları, geniş bir habitatta bulunmaları, laktik asit, mikrobiyal enzim gibi gıdaların üretilmesi ve korunmasında yarar sağlayan metabolitler üretmesi onların probiyotik önemlerini artırmaktadır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için bazı kriterlere sahip olması gerekmektedir (Gülbandılar vd., 2017). Bu kriterlerden en önemlileri konakçıya yararlı etki sağlaması, asit ve safra direncinin olması, bağırsakta kolonize olabilmesi ve GRAS (Genel Olarak Güvenli Bilinen) statüsünde olması gerekmektedir (FAO/WHO, 2002).

Enterokokların probiyotik olarak birçok özelliğe sahip olmalarına rağmen, probiyotik olarak kullanımları hala tartışmalı bir konudur. Bazı enterokokların insan mikrobiyotasında hastalığa bağlı olarak artması, çeşitli virülens genler ve çok fazla ilaç dirençlerinin olması, probiyotik olarak kullanılmalarıyla ilgili endişelerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Franz vd., 2003). Bu nedenlerden dolayı diğer laktik asit bakterilerinden farklı olarak enterokoklar GRAS statüsüne kabul edilmemiştir (Hanchi vd., 2018).

Enterokokların probiyotik olarak kullanılabilmesi için biyogüvenirliliğinin kesin olarak belirlenmesi gerekmektedir. Enterokokların biyogüvenilir olarak değerlendirilebilmesi için bazı potansiyel risk faktörlerini taşımaması gerekmektedir. Bu potansiyel risk faktörleri; antibiyotik dirençliliği, virülans faktörler, biyofilm üretimi ve biyojen amin üretimi olarak sıralanabilir (Kankaya vd., 2017). Biyojen aminler düşük molekül ağırlıklı, toksik azotlu bileşiklerdir. Gıdalarda yüksek miktarlarda bulunmaları çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Ladero vd., 2012). Enterokokların virülans faktörlerinin görülme sıklığı üzerine yapılan çalışmalar, gıdalardan ve sebzeler gibi diğer doğal kaynaklardan izole edilen suşların virülans faktörlerini ve antibiyotik dirençlerini içerebileceğini göstermiştir. Genel olarak, virülans belirleyicilerinin klinik suşlarda oluşumunun, gıdalardan izole edilen *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Leavis vd., 2004; Willems vd., 2001).

2.2.6.1 Enterokoklarda antibiyotik dirençliliği

Antibiyotik direnci bakterilerin antimikrobiyal maddelerin öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı oluşturdıkları dirençtir. Bakterilerde direnç türe özgü (intrensek) veya kazanılmış olarak gerçekleşmektedir (Garrido vd., 2014). Enterokoklar özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlar olmak üzere birçok enfeksiyon hastalığına sebep olmaktadır. Enterokokların klinik önemi, kolonizasyon ve enfeksiyon riskine katkıda bulunan antibiyotik direnci ile doğrudan ilişkilidir. (Christopher vd., 2014). Son yıllarda enterokoklarda antibiyotik direnci giderek artmaktadır (Metan vd., 2005).

Enterokoklar doğal olarak daha önce karşılaşmadıkları antibiyotiklere, türe özgü direnç geliştirebilmekteydiler. Enterokokların türe özgü geliştirdikleri dirence örnek olarak sefalosporinlere, antistafilokokal penisilinlere, aminoglikozidler ve klindamisine gösterilebilir. Kazanılmış direnç ise plazmid ve transpozonlar yoluyla gerçekleşmektedir. Enterokoklarda, kazanılmış antibiyotik direncinin yüksek düzey penisiline karşı olduğu bildirilmiştir (Yıldırım, 2007). Yüksek düzey penisilin direncinin oluşmasında, yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta laktamaz yapımına bağlı olarak gelişen beta laktam direnci veya diğer mekanizmalarla gelişen dirençler rol almaktadır.

Yüksek düzey aminoglikozid direnci ise aminoglikozidlere karşı membrandaki permeabilitenin azalmasıyla, aminoglikozid modifiye edici enzimlerle ya da ribozomal proteinde mutasyon ile oluşan tek aminoasit değişikliği ile oluşmaktadır (Garrido vd., 2014).

Enterokoklarda son yıllarda sık görülen diğer bir antibiyotik direnci ise glikopeptid direncidir. Enterokoklarda ilk kez 1988 yılında bildirilen glikopeptid direnci zaman içerisinde sürekli olarak tüm dünyada yayılım göstermiştir. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıkça rastlanan vankomisin direnci, glikopeptid direncine örnek verilebilir (Courvalin, 2006).

Vankomisin direncinde farklı genlerin rol oynadığı bildirilmiştir (Kristich vd., 2014). Enterokoklarda vankomisine karşı en az sekiz tip (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ve VanN) kazanılmış direnç tespit edilmiştir. VanA , vanB ve VanC en sık rastlanan direnç tipleri olarak belirlenmiştir (Kristich vd., 2014).

Bunlardan VanA tipi direnç enterokoklarda en sık görülen direnç tipidir. Genel olarak, yüksek vankomisin direnci ile ilişkilendirilmiştir ($MIC \geq 128 \mu g / ml$). Bu fenotipi gösteren türlerin çoğu, aynı zamanda teikoplanine de dirençlidir ($MIC \geq 8 \mu g / ml$). Bu direnç türü, glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin vb.) ve polimiksin B gibi farklı antibiyotikler tarafından indüklenir. VanA direncinin prototipi, Tn3 ile ilgili 10851 bp'lik bir transpozon olan Tn1546'dır. Bu transpozon yedi gen içermektedir ve bu genler direnç fenotipinin ifadesi için gereklidir (Garrido vd., 2014). Ayrıca glikopeptitlerin varlığını tespit etmek ve direnç genlerinin ekspresyonunu başlatmak için iki bileşenli bir sinyal iletim sistemini (*vanR*, *vanS*) kodlayan *vanR* ve *vanS* düzenleyici iki gen vardır. *vanS*, vankomisin varlığını saptamak için bir sensör görevi görür. *vanS*, sinyali, tepki düzenleyici olan *vanR*'ye ileterek, dirençteki diğer proteinlerin sentezinin ve aktivasyonunu sağlamaktadır (Kristich vd., 2014).

VanB tipi direnç vankomisin ile muamele sonucu indüklenirken, teikoplaninden etkilenmez. Bu fenotipi kodlayan genlerin konumlandırılması VanA'dan farklıdır. *vanB* geni, düzenleyici genler ile vanHBBXB kümesi arasında bulunur. Ayrıca, *vanA* genlerinin hiçbirisiyle benzerlik göstermeyen *vanW* (bilinmeyen bir fonksiyon) olan ek bir gen vardır (Holmes vd., 2013).

VanC tipi dirençte ise vankomisine düşük düzeyde direnç görülürken, bakteriler teikoplanine karşı duyarlıdır (Courvalin, 2006).

2.2.6.2 Enterokoklarda bulunan virülans faktörler

Virülans faktörleri; konak dokuya yapışma, kolonizasyon, bakteriyel göçü artırma ve konak bağışıklık regülasyonu ile bakterilerin hastalık yapıcı etkisini arttıran bazı efektör moleküllerdir (Busani vd., 2004). Enterokoklarda bildirilen başlıca virülans faktörler; agregasyon maddesi, yüzey adezinleri, enterokokal antijen A, sitolizin, jelatinaz, hiyaluronidaz, seks feromonları, lipoteikoik asit, hücre dışı süper oksit üretimidir (Willems ve Bonten , 2007; İnoğlu ve Tuncer, 2013).

Agregasyon maddesi

Agregasyon maddesi (*agg*, *asa1*) ilk kez *E. faecalis* suşlarında tanımlanan bir yüzey proteindir. Donör ve alıcı bakteri arasında agregat oluşturarak plazmid değişimini kolaylaştıran, feromona duyarlı bakteriyel bir adezindir. Maktrofajlara karşısında sağkalımı koruyarak bağışıklık sistemine karşı bakteriyi korumaktadır (Trotter ve Dunny, 1990). Agregasyon maddesi, konjugasyon fonksiyonuna ek olarak *E. faecalis*'in çeşitli ökaryotik hücrelere yapışmasını sağlayarak endokardit ve üriner sistem enfeksiyonunununa sebep olmaktadır (Koch vd., 2004).

Yüzey adezini

Enterokokal yüzey proteini (*esp*) ilk kez *E. faecalis* MMH5594 suşunda tanımlanmış hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir (Shangar vd., 1999). Yüksek moleküler ağırlıklı yüzey proteini Esp'yi kodlayan enterokok geni, bakteriyemi ve endokardit izolatlarında bol miktarda tespit edilmiştir (Shankar vd., 1999; Archimbaud vd., 2002). Bakterilerde *esp* geni konjugasyonla aktarılabilen bir gendir (Distel vd., 2002; Coque vd., 2005; Upadyaya vd., 2009) ve adezyon, kolonizasyon, immün sistemden korunma ve antibiyotik direncine katkısı vardır. Bunların yanı sıra, *esp* geni bakterilerin stres koşulları altında abiyotik yüzeylere tutunmasını ve biyofilm oluşturarak canlılıklarının devam etmesiyle bağlantılıdır (Foulque Moreno vd., 2006; Toledo-Arana vd., 2001).

Enterokokal antijen A (efaA)

E. faecalis antijen A proteini (EfaAfs) ve *E. faecium* antijen A proteini (EfaAfm) mikroorganizmaların yaşaması ve aktivite göstermesi için gerekli olan mangan reseptörüdür. Mangandan fakir olan ortamlarda daha fazla ifade edilirler. EfaA proteininin amino asit dizisi, adezinler olarak bilinen bir grup streptokok proteinine % 55-60 benzerlik göstermektedir (Low vd., 2003). Bu nedenle, EfaA endokarditle ilişkili bir adhezin olarak işlev görmektedir. Fakat hem klinik hem de gıda izolatlarında EfaA proteinine ait genler bulunabilmektedir (Eaton ve Gasson, 2001).

Sitolizin (Hemolizin)

Sitolizin *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylI* olmak üzere sekiz farklı genle kontrol edilen plazmidde kodlanmış bir toksindir. Ancak kromozomal olarak da kodlanabildikleri bildirilmiştir (Hällgren vd., 2009; Upadhyaya vd., 2009). Sitolizin üretimi ve aktivasyonu birden fazla aşamadan oluşmaktadır. Genel olarak Sitolizinin altbirimleri olan *cylLL* ve *cylLS* ribozomda sentezlendikten sonra *cylM* tarafından translasyon sonrası modifikasyona uğramaktadır. Modifiye edilmiş peptitler *cylB* tarafından hücreden salınarak, *cylA* tarafından aktive edilmektedir (Haas ve Gilmore, 1999). Sitolizin üretimi *cylR1* ve *cylR2* genleriyle kontrol edilen quorum sensing mekanizmasıyla düzenlenmektedir.

Sitolizinler, eritrositleri, makrofajları, Gram pozitif ve negatif bakterileri hedef alır. Sitolizin β -hemolitik aktivite gösterdiği için hemolizin olarak da bilinir (Ike ve Clewell, 1992). Sitolizin üreten bakteriler, bu toksinden kendini henüz bilinmeyen mekanizmalarla korumaktadır. Sitolizinler immün sistem üzerinde ve doku hasarında etkilidir. Yapılan çalışmalarda sitolizin genlerinin ve üretiminin, klinik izolatlarda gıda izolatlarına oranla daha fazla bulunduğu bildirilmiştir (Fernandes ve Dhanashree, 2013).

Jelatinaz

Jelatinaz çinko içeren ekstraselüler bir metalloproteinazdır. Jelatinaz üretiminden sorumlu olan *gelE* geni kromozomal DNA üzerinde bulunmaktadır. Jelatinaz üretimi *fsr* sinyal transdüksiyon sistemi ile düzenlenmektedir (Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Upadhyaya vd., 2009).

Bağ dokuda yer alan jelatin, kollajen, hemoglobin ve endotel doku gibi substratlar üzerinde etkili olan proteolitik bir enzimdir. Konak dokuya zarar vererek bakteriyel göç ve yayılımı sağlamaktadır (Waters vd., 2003). Jelatinaz üretimi klinik izolatlarda gıda izolatlarına kıyasla daha fazla görülmektedir (Kayaoglu ve Orstavik 2004).

Hiyalüronidaz

Hiyalüronidaz, hiyalüronik asit üzerinde etkili olan doku hasarı ile ilişkili bir enzimdir. Hiyaluronidaz, kromozomal *hly* geni tarafından kodlanmaktadır. Spermatozoa gibi memeli hücrelerinden, yılan zehirine, sülüklere ve kancalı kurtlar gibi parazitlere kadar doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Streptokoklar ve diğer bakteriler tarafından da yüksek miktarlarda üretilmektedir. Mukopolisakkaritleri parçalayarak bakteriyel yayılımı ve enfeksiyonu artırmaktadır (Hynes ve Walton, 2000).

Hiyalüronidaz enziminin diğer bir rolü ise bakteriler için besin sağlamaktır. Enzimin substratlarının ürünleri bakteriler için taşınabilen ve sindirilebilen disakkaritlerdir. Hiyalüronidaz enzimi ayrıca diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerinin şiddetini artırabilmektedir (Kayaoglu ve Orstavik 2004).

Seks feromonları

Seks feromonları cinsiyet hormonları olarak da bilinir. Sinyal peptidi olarak görev yapan, 7 ya da 8 amino asit uzunluğunda *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad* genlerinde kromozomal olarak kodlanan, küçük vehidrofobik peptitlerdir (Clewel ve Weaver, 1989). Seks feromonları, agregasyon maddesinin sekresyonundan ve konjugasyondan sorumludur. Alıcı suş, içermediği plazmide uygun seks feromonunu ortama salgıladığında, donör suş, agregasyon maddesini üreterek iki suş arasından plazmit aktarımı gerçekleşmektedir. Seks feromonları, antibiyotik direnci ile sitolizin gibi virülens faktörlerinin bakteriler arasında aktarımını ve yayılmasını sağlamaktadır. Ayrıca doku hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kayaoglu ve Orstavik, 2004).

Lipoteikoik asit

Genel olarak gram pozitif bakterilerin hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Agregasyon maddesi için reseptör görevi görerek konjugasyonla plazmit aktarımını kolaylaştırmaktadır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004). Ayrıca streptokoklar üzerinde inhibisyon etkisi vardır (Bab vd., 1979).

Hücre dışı süper oksit üretimi

Ekstraselüler süper oksit, hücre ve dokularda hasara yol açan reaktif bir oksijen radikalidir. Nötrofiller ve diğer fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesi için süperoksit üretimi gerçekleşmektedir. Üretilen süper oksit mikroorganizmaların öldürülmesi dışında iltihap bölgesinde doku hasarına da sebep olmaktadır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004). Konakçı hücreler tarafından üretime ek olarak, bakterilerde süperoksit anyonu üretebilir. *E. faecalis*'lerin çoğu, *E. faecium*'ların ise bazıları süper oksit üretmektedir. Bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen suşların yüksek oranda süper oksit ürettiği bildirilmiştir (Marton vd., 1993).

2.2.6.3 Enterokoklarda biyofilm oluşumu

Biyofilm çeşitli canlı ve cansız yüzeyler üzerine tutunmuş hücre popülasyonudur (Costerton, 2001). Biyofilmler; bakteri gruplarının proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve ekzopolimerik maddelerle birlikte oluşturduğu yapılardır (Vlamakis vd., 2013). Biyofilm içerisindeki organizmalar; besin eksikliği, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi olumsuz koşullara karşı daha dirençlidirler. Biyofilmler, birçok kronik enfeksiyonların kaynağıdır ve tedavi edilmesi oldukça zordur (Lewis, 2001).

E. faecalis tarafından biyofilm oluşumunda, Esp adezyon proteini, lipoteikoik asit alanin esterifikasyonu gibi pek çok mekanizmanın etkili olduğu bildirilmiştir (Mohamed ve Huang, 2007). Bu mekanizmalar içerisinde Esp en iyi tanımlanan mekanizma olarak belirlenmiştir. Yüzey proteini olan Esp, epitel yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşumundan sorumlu virülens faktördür (Toledo vd., 2001). Biyofilm oluşumunu sağlayan diğer mekanizmalardan birisi de jelatinaz aktivitesidir.

E. faecalis' te biyofilm oluşumu, iyi tanımlanmış çekirdek algılama sistemi, fsr (fokal streptokok regülatör) lokusu ile düzenlenmektedir. Bu lokus jelatinaz aktivitesini düzenlemektedir. Metaloproteaz olan jelatinaz; kollajen, kazein ve hemoglobini parçalara ayırır ve daha sonra biyofilm oluşmasına sebep olmaktadır (Hancock & Perego, 2004).

Ancak biyofilm oluşumu bu virülans faktörlerle ilişkili olmasına rağmen bu faktörlerin varlığı her zaman biyofilm oluşumu ile sonuçlanmamaktadır (Mohamed ve Huang, 2007).

Biyofilm oluşturmuş bakteriler kalp kapağı iltihabı, ateşli yara enfeksiyonları ve kronik orta kulan iltihabı gibi hastalıklara sebep olabilmektedirler. Ayrıca çeşitli protezlerin ve implantların üzerine de kolonize olmaktadır (Mohamed ve Huang, 2007).

3.MATERYAL ve METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Materyal örnekleri

Çalışmada kullanılan 12 *Enterococcus faecalis* ve 8 *Enterococcus faecium* suşları Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan, Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'dan temin edilmiştir. *Enterococcus* suşları, Türkiye ve İran'ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilerek tanımlanmış, antimikrobiyal aktivite, antibiyotik dirençlilikleri, laktik asit üretimi, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, agregasyon, koagregasyon, yapay mide ve bağırsak sıvısında canlılık ve hidrofobisite gibi probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Biyokimyasal özellikleri belirlenmiş ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır.

Ayrıca çalışmamızda *E. faecium* ATCC 19434 ve *E. faecalis* NCDO 581 suşlarında referans suş olarak kullanılmıştır. Kullanılan toplam 22 suşun temin edildikleri izolasyon kaynakları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırma kapsamında kullanılacak suş listesi ve izolasyon kaynakları.

No.	Probiyotik Özellikleri Belirlenen Suşlar	İzolasyon Kaynağı Peynirler
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	Ardabil (Tam Yağlı)
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	Ardabil (Tam Yağlı)
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	Ardabil (Tam Yağlı)
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	Ahvaz (Yarım Yağlı)
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	Ahvaz (Yarım Yağlı)
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	Ahvaz (Yarım Yağlı)
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	Ahvaz (Yarım Yağlı)
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	Hamadan (Yarım Yağlı)
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	Ahbar (Tam Yağlı)
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	Ahbar (Tam Yağlı)
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	Ahbar (Tam Yağlı)
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	Ahbar (Tam Yağlı)
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	Ahbar (Tam Yağlı)
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	Ahbar (Tam Yağlı)
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	Balıkesir (Yarım Yağlı)
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)

Çizelge 3.1 (devamı). Araştırma kapsamında kullanılacak suş listesi ve izolasyon kaynakları.

No.	Probiyotik Özellikleri Belirlenen Suşlar	İzolasyon Kaynağı Peynirler
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	Balıkesir (YarımYağlı)
21	<i>E. faecium</i> *	ATCC 19434
22	<i>E. faecalis</i> **	NCDO 581

RT: Türkiye peynirlerinden izole edilen suşlar

RI: İran peynirlerinden izole edilen suşlar

*: American Type Culture Collection

**: National Collection of Food Bacteria

3.1.2 Araştırmada kullanılan besiyerleri

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının aktifleştirilmesi ve geliştirilmesinde Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı ve katı besiyeri (Merck) kullanılmıştır. Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Man Rogosa ve Sharpa (MRS) besiyeri.

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Et Ekstaktı	8 ,0
Maya Ekstrakt	4,0
Glukoz	20,0
Tween 80	1,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Amonyum Sitrata	2,0
Sodyum asetat. 4 H ₂ O	5,0

MRS sıvı besiyeri hazırlamak için bileşimi yukarıda miktarlarda verilen toz halindeki MRS Broth (Merck) besiyerinden 52,2 g tartılıp bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. MRS katı besiyeri için ise, sıvı besiyerine %1,5 oranında agar (Merck) ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Besi ortamının pH’sı 1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak 6,8±0,2’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’da 15 dk steril edilmiştir.

Çalışmada pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan test bakterilerinin aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi için, Nutrient Broth (NB) besiyeri (Merck) ve Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri (Merck) kullanılmıştır. Nutrient Broth (NB) ve Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinin içeriği Çizelge 3.3’de ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri.

Maddeler	g/L
Kazein'den elde edilen Pepton	17,0
Soya fasulyesinden elde edilen Pepton	3,0
D(+) Glukoz	2,5
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	2,5

TSB sıvı besiyeri hazırlamak için Çizelge 3.3’te bileşimi verilen toz halindeki TSB (Merck) besiyerinden 30 g tartılıp bir miktar distile su kullanılarak çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. TSB katı besiyeri için ise, sıvı besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Besi ortamının pH’sı 1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’da 15 dk steril edilmiştir.

Çizelge 3.4. Nutrient Broth (NB) besiyeri.

Maddeler	g/L
Et’den elde edilen Pepton	5,0
Et ekstrakt	3,0

NB sıvı besiyeri hazırlamak için Çizelge 3.4’te bileşimi verilen toz halindeki NB (Merck) besiyerinden 8 g tartılıp bir miktar distile su kullanılarak çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. NB katı besiyeri için ise, sıvı besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Besi ortamının pH’sı 1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak $7,00 \pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’da 15 dk steril edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Müller Hinton Agar (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Müller-Hinton Agar besiyerinin içeriği Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Müller-Hinton Agar besiyeri.

Maddeler	g/L
Et İnfüzyonu	2,0
Kazein Hidrolizat	17,5
Nişasta	1,5
Agar-Agar	13,0

Müller Hinton Agar besiyeri hazırlamak için bileşimi yukarıda verilen Muller Hinton Agar toz besiyerinden 34 g tartılıp bir miktar distile su kullanılarak çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. Besi ortamının pH’sı 1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak $6,8\pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’da 15 dk steril edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium*. suşlarının sitolizin aktivitelerini belirlemek için içeriği Çizelge 3.6’da verilen ve ticari olarak hazır satılan Koyun Kanlı Agar (Or-Bak) kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Koyun Kanlı Agar (Or-Bak).

Maddeler	Miktar
Triptoz	10 g/L
Sığır Kalp Ekstresi	10 g/L
NaCl	5 g/L
Koyun Kanı	50 ml/L
Agar Agar	15 g/L

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının jelatin hidroliz aktivitelerini belirlemek için Nutrient Gelatin (Fluka) besi ortamı kullanılmıştır. Nutrient Gelatin besiyerinin içeriği Çizelge 3.6’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Nutrient Gelatin besiyeri.

Maddeler	g/L
Pepton	5,0
Et ekstrakt	3,0
Jelatin	120,0

Nutrient Gelatin (Fluka) besiyeri hazırlamak için bileşimi yukarıdaki verilen toz halindeki hazır besiyerinden 128 g tartılıp bir miktar ılık (yaklaşık 50°C) distile su kullanılarak çözdürüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Besi ortamının pH'sı 1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak 6,8±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'da 15 dk steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler dik pozisyonda oda sıcaklığında soğutulup kullanılmıştır.

3.1.3 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS besiyeri; *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşlarının geliştirilmesinde ve aktifleştirilmesinde NB besiyeri; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, suşlarının geliştirilmesinde ve aktifleştirilmesinde TSB besiyeri kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda bakteriler 37 ± 1 °C' de 24 saatlik aerobik inkübasyonu ile geliştirilmiştir. Deneylerde iki kere aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Deneyler sırasında Gram boyama tekniğiyle mikroskopik olarak kontaminasyon riskine karşı kontroller yapılmıştır.

3.1.4 Test bakterileri

E. coli ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, ve *S. epidermidis* ATCC 12228 test bakterisi olarak kullanılmıştır. Test bakterileri, sıvı besiyerinde 37°C'da 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak Çizelge 3.8' de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Test bakterileri ve temin edildiği kaynak.

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak
<i>E. coli</i> ATCC 35218	R.S.K.K.
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	H.Ü.
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	G.Ü.
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	G.Ü.

R.S.K.K. : Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu

H.Ü. : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

G.Ü. : Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı

3.1.5 Antibiyotikler

Çalışmada *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için hücre duvar sentezini, protein sentezini, nükleik asit sentezini ve sitoplazmik zar sentezini inhibe eden 10 farklı antibiyotik diski kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Antibiyotik diskleri ve etki mekanizmaları.

Antibiyotik diskleri	Grubu	Etki mekanizması	Konsantrasyon
Rifampisin (RD5)	Ansamisin	Nükleik asit sentezi inhibitörü	5 µg
Ampisilin (AM10)	β –laktam	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	10 µg
Polimiksin B (PB300)	Polimiksin	Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	300 Units
Kloramfenikol(C30)	Fenikol	Protein sentezi inhibitörü	30 µg
Eritromisin (E15)	Makrolid	Protein sentezi inhibitörü	15 µg
Tetrasiklin (TE30)	Tetrasiklin	Protein sentezi inhibitörü	30 µg
Vankomisin (VA30)	Glikopeptid	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	30 µg
Gentamisin (CN30)	Aminoglikozid	Protein sentezi inhibitörü	30 µg
Penisilin G (P10)	Penisilin	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	10 Units
Ofloksasin (OFX5)	Kinolon	Nükleik asit sentezi inhibitörü	5 µg

3.1.6 Primerler

Enterokoklar, birçok ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu enfeksiyonların en önemli sebepleri bakterinin hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller ve antibiyotik dirençliliği örnek verilebilir. Hastalık yapıcı efektör moleküller virülens faktörler olarak adlandırılır (Busani vd., 2004). Çizelge 3.10’da çalışmamız kapsamında araştırılacak vankomisin direnç genlerine ve virülens faktörlere ait olan genlere spesifik primerler verilmiştir.

Çizelge 3.10. Enterokokal virulans ve direnç faktörlerine ait primer dizileri.

Gen	Virulans Faktör	Primer dizisi (5'-3')	Tm°C	Referans
<i>vanA</i>	Vankomisin direnç	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA	48°C	(Armin vd., 2017)
		CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA		
<i>vanB</i>	Vankomisin direnç	CCGCCATCCTCCTGCAAAAA	49°C	(Armin vd., 2017)
		GTGACAAACCGGAGGCGAGG		
<i>cylA</i>	Sitolizin	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	49°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Hällgren vd., 2009)
		TCTACAGTAAATCTTTCGTCA		
<i>cylB</i>	Sitolizin	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	47°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Hällgren vd., 2009)
		AATAAACTCTTCTTTTCCAAC		
<i>gelE</i>	Jelatinaz	ACCCCGTATCATTGGTTT	51,2° C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu vd., 2015)
		ACGCATTGCTTTTCCATC		
<i>Esp</i>	Enterokokkal yüzey proteini	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	58°C	(Eaton ve Gasson, 2001)
		GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
<i>asa1</i>	Agregasyon faktörü	GCACGCTATTACGAACTATGA	48°C	(Vankerckhoven vd., 2004; Ahmadova vd., 2013; Cebrián vd., 2012)
		TAAGAAAGAACATCACCACGA		
<i>Agg</i>	Hücre agregasyonu ve konjugasyonu	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	49°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Pieniz vd., 2015)
		AAACGGCAAGACAAGTAAATA		
<i>efaAfs</i>	<i>E. faecalis</i> Yüzey Antijeni	GACAGACCCTCACGAATA	48°C	Mansour vd., 2014; Noguchi vd., 2011)
		AGTTCATCATGCTGTAGTA		
<i>efaAfm</i>	<i>E. faecium</i> Yüzey Antijeni	AACAGATCCGCATGAATA	47°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu vd., 2015)
		CATTCATCATCTGATAGTA		
<i>Cob</i>	Seks Feromon Determinantları	AACATTACAGCAAACAAAGC	48°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu vd., 2015)
		TTGTCATAAAGAGTGGTGAT		
<i>Ccf</i>	Seks Feromon Determinantları	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	51,2° C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu vd., 2015)
		AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT		
<i>Hyl</i>	hiyaluronidaz	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	52°C	(Vankerckhoven vd., 2004; Liu vd., 2015)
		GACTGACGTCCAAGTTTCCAA		

3.2 Metot

3.2.1 Bakterilerin muhafazası

Bakterileri uygun sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Gliserol 0,4 mL olacak şekilde kapaklı cryo tüplerine ilave edilerek, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilip, -40 °C'de muhafazaya alınmış ve stoklar altı ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2 Enterokokların hemolizin aktivitesinin belirlenmesi

E. faecium ve *E. faecalis* suşlarının hemolizin (sitolizin) aktivitesinin belirlenmesi Al Atya vd., (2015) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Çalışmada *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları MRS sıvı besiyerinde 2 kez aktive edilerek 37°C'da 24 saat inkübe edilen kültürleri kullanılmıştır. Aktif kültürler, inkübasyon sonunda 4000 rpm'de 10 dk santrifüj (Hettich, Universal 320 R) edilmiştir. Pelletler % 0,875'lik serum fizyolojik ile iki kez yıkanmıştır. Kültürlerin yoğunluğu serum fizyolojik ile McFarland 0,5 e (~ 600 nm de 0,08 – 0,1 OD) ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan kültürlerden Kanlı Agara (Or- Bak) çizgi ekim yapılarak 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kolonilerin etrafında, zon oluşturmayanlar γ -hemolitik; parlak-yeşil zon oluşturanlar α - hemolitik, berrak zon oluşturanlar ise β -hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada *E. coli* ATCC 35218 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşları sitolizin aktivitesi deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Anas vd., 2014 ; Taheur vd., 2016).

3.2.3 Enterokokların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Çalışmada starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan antibiyotikler kullanılmıştır. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Sanchez vd., (2007)'e göre disk difüzyonun yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Mueller Hinton katı besiyerine üzerine McFarland 0,5' e ayarlanan aktif kültürlerden (600 nm de 0,08 – 0,1 optikal yoğunluğunda) 100 μ L aktarılmıştır ve steril drigalski spatülü ile besiyerine üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Besiyeri ve bakteri içeren petri üzerine denenecek olan antibiyotik diskleri steril koşullarda yerleştirilmiştir ve 37°C'de aerobik koşullarda 18 saat inkübasyona (Vankomisin antibiyotiği için 24 saat inkübasyon) bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2015).

3.2.4 Enterokokların jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının jelatinaz aktivitesinin belirlenmesinde Nutrient Gelatin besiyerine (Çizelge 3.7) McFarland 0,5' e ayarlanan aktif kültürlerden (600 nm de 0,08 – 0,1 optikal yoğunluğunda) inokülasyon yapılmış 37°C'da 10-30 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler buzdolabı sıcaklığında 1–2 saat bekletilmiştir. Buzdolabından alındıktan sonra sıvı durumundaki örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2014). Ekim yapılmayan besiyeri ve *E. coli* ATCC 35218 suşu negatif kontrol olarak (URL-1); *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Anas vd., 2014).

3.2.5 Enterokokların biyofilm aktivitesinin belirlenmesi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının biyofilm oluşumunun belirlenmesi Stepanović vd., (2007) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Bu yönteme göre, aktif *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarından katı besiyerine çizgi ekim tekniği ile inokülasyon yapılarak 37°C'da 24 saat katı besiyerinde geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyerinde gelişen kolonilerden 3-4 tanesi MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'da 24 saat inkübasyon ile tekrar geliştirilmiştir. Sıvı besi ortamında gelişen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarına ait kültürlerin yoğunluğu MRS sıvı besiyeri içinde McFarland 0,5-1,00 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan kültürler 1/100 oranında MRS sıvı besiyeri içinde dilüsyon yapılmış ve başlangıç canlı bakteri oranı kob/mL olarak MRS agara yapılan ekimlerle belirlenmiştir. 96 kuyulu mikropate'e 1/100 oranında dilüsyon yapılmış kültürlerden üçer paralelli olarak, cut-off değeri için ise altı paralelli olarak boş MRS sıvı besiyeriden 200 µL eklenmiştir. İnokülasyon yapılan mikropate 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin gelişme oranı 600 nm'de spektrofotometre (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-VIS) ile ölçülüp kaydedilmiştir. Biyofilm aktivitesi olan bakteri oranını belirlemek için, kuyulardaki besiyeri kalıntısı ve askıda kalan bakterileri uzaklaştırmak üzere kuyular ayrı ayrı üç kez 300 µL steril PBS (NaCl %0,8, KCl % 0,02, Na₂HPO₄ %0,144, KH₂PO₄ %0,024, pH 7,2) ile yıkanmıştır. Üçüncü yıkama işleminin ardından kuyu içerisinden PBS tamamen uzaklaştırılmış ve kuyu yüzeyindeki bakterileri sabitlemek için kuyular 20 dakika boyunca 150 µL metanol ile fikse edilmiştir.

Fiksasyon işleminden sonra metanol ortamdan yavaşça uzaklaştırılmış ve mikrolate açık bir şekilde ters pozisyonda oda sıcaklığında bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Sabitlenen bakteriler 150 µL kristal violet ile 15 dakika boyanmış ve boya mikrolateden mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Mikrolate akan musluk suyu altında serbest boya tamamen uzaklaşana kadar yıkanarak ters bir pozisyonda kurumaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra, hücrelere bağlanan boya 150 µL % 33'lük glasiyel asetik asit ile yeniden çözündürülmüştür. Kristal violet ile boyanan her bir kuyunun optik yoğunluğu (OD), bir mikrolate okuyucu (Chromate, Awareness Technology Inc) kullanılarak 492 nm'de ölçülmüştür (Marinho vd., 2013). Test edilen tüm suşların, pozitif ve negatif kontrollerin ortalama OD değerleri hesaplanmıştır. Boş besiyerlerin ortalama OD'si ile negatif kontrolün standart sapması toplanarak cut-off değeri (OD_c) oluşturulmuştur. Test suşunun nihai OD'si ise ölçülen OD değerinin ortalamasından cut-off değerinin çıkartılmasıyla elde edilmiştir.

Test edilen suşların biyofilm aktivitesi aşağıda verilen ölçüt baz alınarak belirlenmiştir. Buna göre;

* $OD \leq OD_c$ ise biyofilm aktivitesi yok,

* $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ise zayıf biyofilm aktivitesi var,

* $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ise orta düzey biyofilm aktivitesi var,

* $4 \times OD_c < OD$ ise güçlü biyofilm aktivitesi şeklinde değerlendirilmiştir (Stepanović vd., 2007).

Biyofilm aktivitesinin belirlenmesi deneyinde, *E. faecalis* ATCC 29212 suşu pozitif kontrol olarak (Rahimi vd., 2018); *S. epidermidis* ATCC 12228 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Torlak vd., 2017). Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan suşlarının biyofilm aktivitesinin belirlenmesinde besi ortamı olarak sıvı ve katı TSB kullanılmıştır.

3.2.6 Genomik DNA izolasyonu

Enterococcus cinsine ait bakterilerin genomik DNA' ları, GeneJet Genomik DNA İzolasyon kiti (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflıklarını ve miktarlarını belirlemek amacıyla 260/280 oranı nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 200 spectrophotometer) ile ölçülmüştür. İzole edilen DNA'lar bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere için -40 °C' de saklanmıştır. Çalışmalarda *E. faecium* ATCC 19434 ile *E. faecalis* NCDO 581 suşları referans suş olarak kullanılmıştır.

3.2.7 Virulans ve direnç genlerinin belirlenmesi

3.2.7.1 Vankomisin direnç genleri (*vanA* ve *vanB*)

Enterokoklar plazmid ve transpozon yoluyla birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmişlerdir (Yıldırım, 2007). Enterokoklarda son yıllarda çok sık rastlanan ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda görülen antibiyotik direnci glikopeptid türevi olan vankomisin direncidir (Cantón vd., 2010). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda vankomisin direnci gen düzeyinde incelenmiştir. Vankomisin direnç genleri Çizelge 3.10'de verilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PZR için toplam hacim 50 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği ve hacmi Çizelge 3.11'de verilmiştir (Poeta vd. 2005).

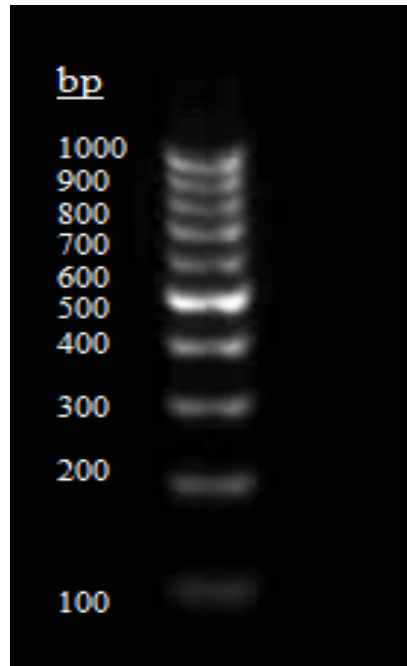
Çizelge 3.11. *vanA* ve *vanB* genlerine ait PZR reaksiyonu.

PZR karışım içeriği	Reaksiyon hacmi
Steril distile su	40,05 µL
Taq Buffer (10X) (20mM MgCl ₂)	5 µL
dNTP (10mM)	0,2 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	5 µL
DNA (20 ng)	2,5 µL
Toplam	50 µL

PZR koşulları

94°C.....	5 dk	}	30 DÖNGÜ
94 °C.....	1 dk		
Tm °C.....	1 dk		
72 °C.....	1 dk		
72 °C.....	10 dk		
+4°C.....	∞		

PZR reaksiyonu için Thermal Cycler (Thermo Scientific) cihazı kullanılmıştır. PZR ürünlerinden, 9 µL amplikon 1 µL DNA yükleme boyası (DNA loading dye, Thermo Scientific) ile karıştırılmış ve %1,5 lik agaoroz jelde 1,5 saat 80 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE (Tris Base (Triz) 4,84 g/L, Glasiyel Asetik Asit 1,14 mL/L, EDTA 0,372 g/L, pH 8,00)'de eletroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri moleküler ağırlık (100 bp DNA Ladder; Jena Bioscience) standardı (Şekil 3.1) ile karşılaştırılarak görüntüleme sisteminde (Uvitec, Cambridge) incelenmiştir.



Şekil 3.1 Genomik DNA moleküler büyüklük standardı.

3.2.7.2 Sitolizin genleri, jelatinaz, enterokokkal yüzey proteini, hücre agregasyon ve konjugasyon, *E. faecalis* yüzey antijeni, *E. faecium* yüzey antijeni, seks feromon determinantları (*cylA*, *cylB*, *gelE*, *esp*, *agg*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cob*, *ccf*)

Enterokokların genomik DNA'ları izole edildikten sonra Sitolizin (*cylA*, *cylB*), Jelatinaz (*gelE*), Enterokokkal Yüzey Proteini (*esp*), Hücre Agregasyon ve Konjugasyon (*agg*), *E. faecalis* Yüzey Antijeni (*efaAfs*), *E. faecium* Yüzey Antijeni (*efaAfm*), Seks Feromon Determinantları (*cob*, *ccf*) gibi virülens faktörlere ait genler Çizelge 3.10'de verilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır.

PZR için toplam hacim 45 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği ve hacmi Çizelge 3.12'de verilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001).

Çizelge 3.12. *cylA*, *cylB*, *gelE*, *esp*, *agg*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cob* ve *ccf* genlerine ait PZR reaksiyonu.

PZR karışım içeriği	Reaksiyon hacmi
Steril distile su	31,25 µL
Taq Buffer (10X)	5 µL
MgCl ₂	3 µL
dNTP (10mM)	1 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
DNA (20 ng)	2,5 µL
Toplam	45 µL

PZR koşulları

94°C.....	5 dk	
94 °C.....	2 dk	1 DÖNGÜ
Tm °C.....	2 dk	
72 °C.....	2 dk	
92 °C.....	15sn	30 DÖNGÜ
Tm °C.....	15 sn	
72 °C.....	15 sn	
72 °C.....	10 dk	
+4°C.....	∞	

PZR reaksiyonu için Thermal Cycler (Thermo Scientific) cihazı kullanılmıştır. PZR ürünlerinden, 9 µL amplikon 1 µL DNA yükleme boyası (DNA loading dye, (Thermo Scientific) ile karıştırılmış ve %1,5 lik agaoroz jelde 1,5 saat 80 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE'de elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri moleküler ağırlık standardı (Şekil 3.1) ile karşılaştırılarak Uvitec görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

3.2.7.3 Agregasyon faktörü ve hiyaluronidaz (*asa1* ve *hyl*)

Çalışmamızda gen taraması yapılan diğer virülens faktörler olan Agregasyon Faktörü (*asa1*) ve Hiyaluronidaz (*hyl*) ait genler Çizelge 3.10'de verilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PZR için toplam hacim 50 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği ve hacmi Çizelge 3.13'de verilmiştir (Ahmadova vd., 2013).

Çizelge 3.13. *asa1* ve *hyl* genlerine ait PZR reaksiyonu.

PZR karışım içeriği	Reaksiyon hacmi
Steril distile su	39,45 µL
Taq Buffer (10X) (20mM MgCl ₂)	5 µL
MgCl ₂	0,3 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
DNA (20 ng)	2,5 µL
Toplam	50 µL

PZR koşulları

94°C.....	5 dk	
94 °C.....	30 sn	} 30 DÖNGÜ
Tm °C.....	30 sn	
72 °C.....	1 dk	
72 °C.....	7 dk	
+4°C.....	∞	

PZR reaksiyonu için Thermal Cycler (Thermo Scientific) cihazı kullanılmıştır. PZR ürünlerinden, 9 µL amplikon 1 µL DNA yükleme boyası (DNA loading dye, (Thermo Scientific) ile karıştırılmış ve %1,5 lik agaoroz jelde 1,5 saat 80 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE'de elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri moleküler ağırlık standardı (Şekil 3.1) ile karşılaştırılarak Uvitec görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

3.2.8 DNA dizi analizi

Elde edilen PZR ürünleri saflaştırılacak ve dizi analizi Nitta Laboratuvar Ürünleri İthalat İhracat Limited firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Sonuçlar, Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9 Plazmid DNA izolasyonu

Enterococcus cinsine ait bakterilerin plazmid DNA' ları, Plasmid Miniprep DNA İzolasyon kiti (GeneMATRIX) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmid DNA'ların saflıklarını ve miktarlarını belirlemek amacıyla 260/280 oranı nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 200 spectrophotometer) ile ölçülmüştür. İzole edilen plazmid DNA'lar % 0,7'lik agaroz jelde (Meyers vd., 1976), 2,5 saat 40 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE'de elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak Uvitec görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

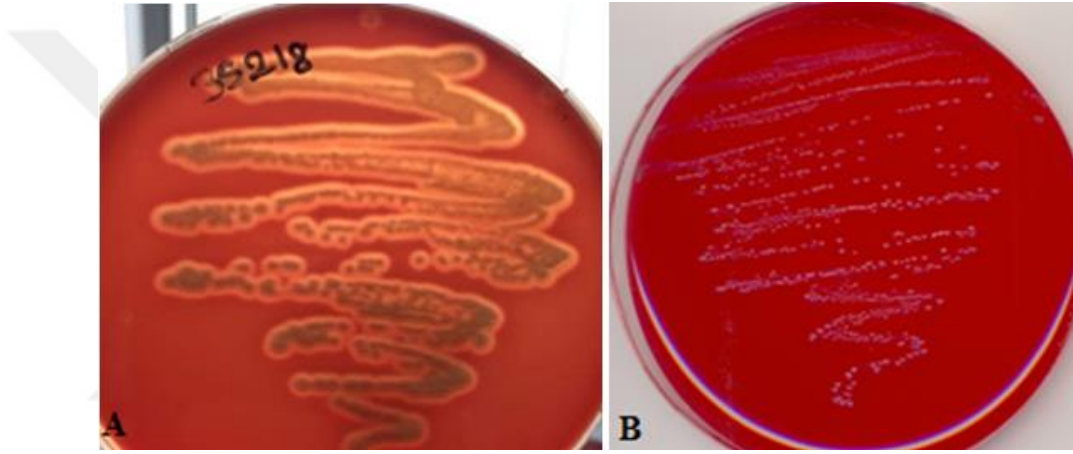
3.2.10 İstatistiksel analiz

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar SPSS bilgisayar programı kullanılarak Ki-kare testi ile istatistiksel olarak analiz edildi.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1 Enterokokların Hemolizin Aktivitesinin Belirlenmesi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının hemolizin aktivitesi koyun kanlı agar besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan β -hemolitik *Escherichia coli* ATCC 35218 suşunun kanlı agar besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturduğu gözlenmiştir. Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ise kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmamayan γ -hemolitik suşlar oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sitolizin aktivitesi A: *Escherichia coli* ATCC 35218 (Pozitif Kontrol), B: *Enterococcus faecalis* RT 122.

4.2 Enterokokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları bu bakterilerin ileride probiyotik olarak kullanılabilmesinde belirleyici olduğu için araştırılmıştır. Sonuçlar CLSI (Çizelge 4.1) standardına göre değerlendirilmiş ve Çizelge 4.2’ de verilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları hücre duvar sentezini inhibe eden ampisilin (10 μ g), vankomisin (30 μ g) ve penisilin (10 Units); protein sentezini inhibe eden kloramfenikol (30 μ g), eritromisin (15 μ g), tetrasiklin (30 μ g) ve gentamisin (30 μ g); nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (5 μ g) ve ofloksasin (5 μ g); sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin B (300 Units) antibiyotiğine karşı test edilmiştir (Şekil 4.3).

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının antibiyotiklere göstermiş oldukları yüzde duyarlılık oranları Çizelge 4.3'te ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının (referans suşlar hariç) polimiksin B antibiyotiği dışında tüm antibiyotiklere %15 ile %100 arasında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Kloromfenikol, gentamisin, vankomisin ve penisilin antibiyotiklerine suşların tamamının yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının, protein sentezini inhibe eden tetrasiklin (%90), nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%35) ve hücre duvar sentezini inhibe eden ampisilin (%35) antibiyotiklerinede duyarlı oldukları gözlemlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılığı testi sonucunda, suşların sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin B (%100) ve hücre duvarı sentezini inhibe eden ampisilin (%65) antibiyotiklerine yüksek oranda dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.

Etki mekanizmaları	Antibiyotik diskleri	Dirençli	Orta Derecede Duyarlı	Duyarlı
Nükleik asit sentezi inhibitörü	Rifampisin (RD5)	≤ 16	17-19	≥ 20
Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampisilin (AM10)	≤ 16	-	≥ 17
Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	Polimiksin B (PB300)	≤ 8	9-11	≥ 12
Protein sentezi inhibitörü	Kloramfenikol (C30)	≤ 12	13-17	≥ 18
Protein sentezi inhibitörü	Eritromisin (E15)	≤ 13	14-22	≥ 23
Protein sentezi inhibitörü	Tetrasiklin (TE30)	≤ 14	15-18	≥ 19
Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Vankomisin (VA30)	≤ 14	15-16	≥ 17
Protein sentezi inhibitörü	Gentamisin (CN30)	-	≤ 9	≥ 10
Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Penisilin G (P10)	≤ 14	-	≥ 15
Nükleik asit sentezi inhibitörü	Ofloksasin (OFX5)	≤ 14	15-21	≥ 22

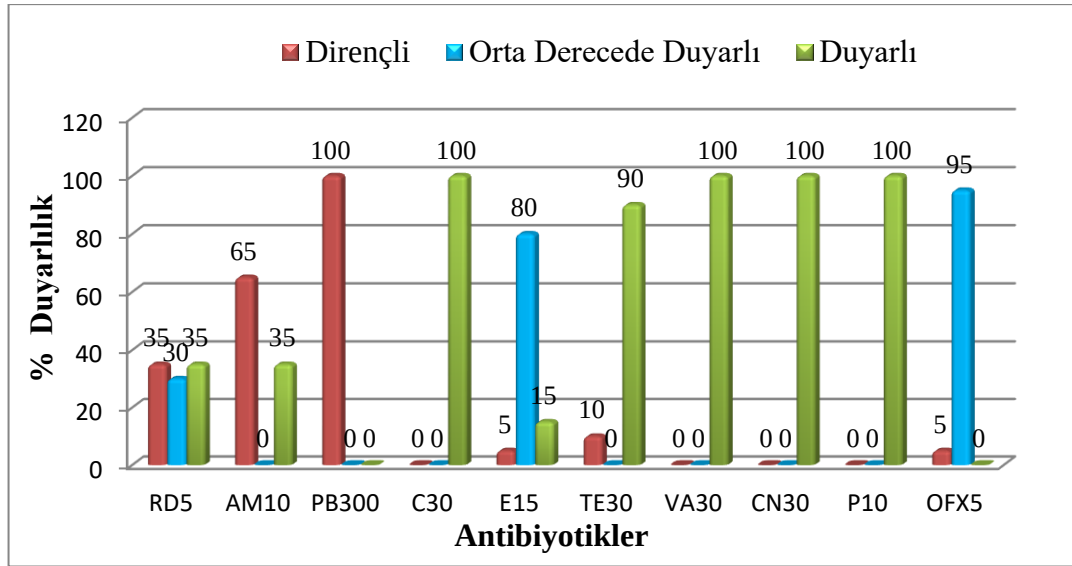
Çizelge 4.2. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.

Antibiyotik Bakteri	RD 5	AM 10	PB 300	C 30	E 15	TE 30	OFX 5	VA 30	CN 30	P 30	MAR
RI 42	++	++	-	++	+	++	-	++	++	++	0,2
RI 48	++	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RI 51	++	++	-	++	+	++	+	++	++	++	0,1
RI 56	-	++	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RI 57	++	++	-	++	+	++	+	++	++	++	0,1
RI 58	-	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,3
RI 59	-	-	-	++	-	++	+	++	++	++	0,4
RI 66	++	++	-	++	+	++	+	++	++	++	0,1
RI 6	+	-	-	++	+	-	+	++	++	++	0,3
RI 8	+	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RI 11	-	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,3
RI 17	+	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RI 19	+	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RI 21	+	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,2
RT 84	-	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,3
RT 96	+	++	-	++	++	++	+	++	++	++	0,1
RT 97	++	++	-	++	+	++	+	++	++	++	0,1
RT 98	-	-	-	++	+	++	+	++	++	++	0,3
RT 102	++	-	-	++	++	-	+	++	++	++	0,3
RT 122	-	-	-	++	++	++	+	++	++	++	0,3
DSMZ 20447	-	-	-	+	-	++	+	++	-	-	0,6
NCDO 581	+	++	-	++	++	++	++	++	++	++	0,1

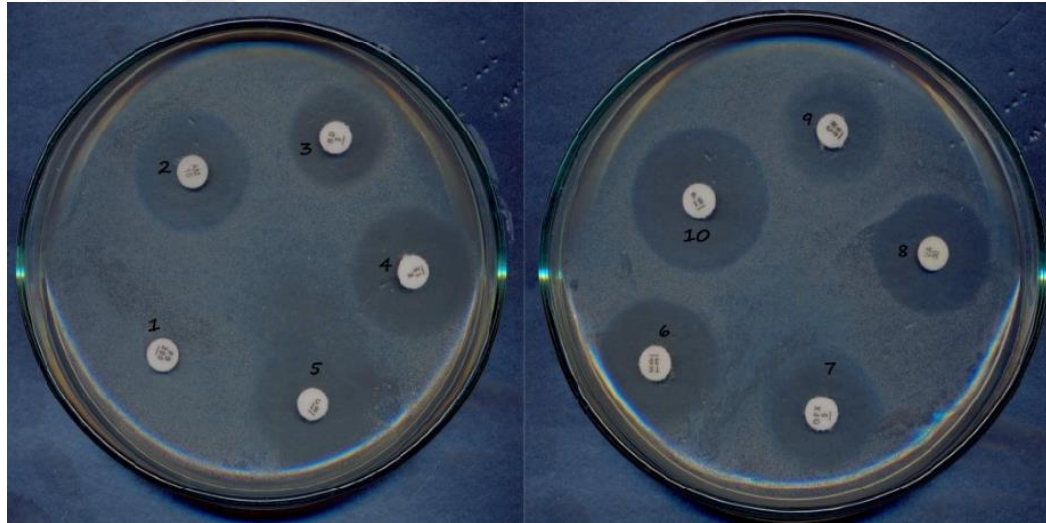
++: duyarlı, +: orta derecede duyarlı, -: dirençli; MAR(Çoklu antibiyotik direnci)=X/Y, X: direnç oluşan antibiyotik sayısı, Y: toplam antibiyotik sayısı

Çizelge 4.3. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotik diskleri	Dirençli	Orta Derecede Duyarlı	Duyarlı
Rifampisin (RD5)	35	30	35
Ampisilin (AM10)	65	0	35
Polimiksin B (PB300)	100	0	0
Kloramfenikol(C30)	0	0	100
Eritromisin (E15)	5	80	15
Tetrasiklin (TE30)	10	0	90
Vankomisin (VA30)	0	0	100
Gentamisin (CN30)	0	0	100
Penisilin G (P10)	0	0	100
Ofloksasin (OFX5)	5	95	0



Şekil 4.2. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.



Şekil 4.3. *Enterococcus faecalis* RT 97 suşunun antibiyotiklere göstermiş olduğu disk difüzyon sonuçları 1: Polimiksin B (PB300), 2: Ampisilin (AM10), 3: Rifampisin (RD5), 4: Eritromisin (E15), 5: Kloramfenikol (C30), 6: Tetrasiklin (TE30), 7: Ofloksasin (OFX5), 8: Vankomisin (VA30), 9: Gentamisin (CN30), 10: Penisilin G (P10).

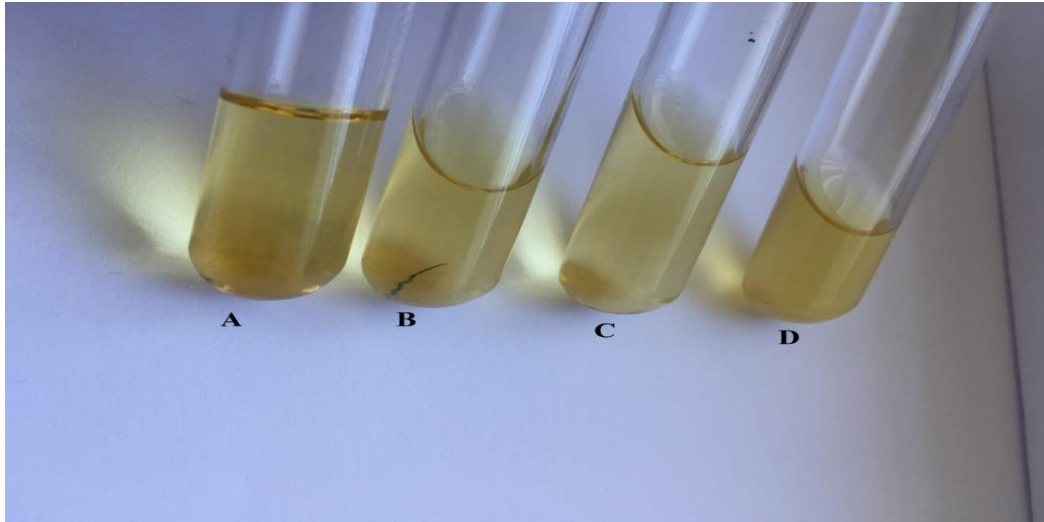
4.3 Enterokokların Jelatinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının jelatinaz aktiviteleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının jelatin hidroliz sonuçları, pozitif kontrol *S. aureus* ATCC 25923 ve negatif kontrol *E. coli* ATCC 35218 suşları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Test edilen 22 *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarından *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21 ve *E. faecalis* RT 84 suşlarında jelatinaz aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının jelatinaz testinin sonuçları.

Test Bakterileri	Jelatinaz aktivitesi
<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	-
<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	+
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	+
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	+
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	+
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	-
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-
<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-
<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+



Şekil 4.4. Jelatinaz aktivitesi sonuçları A: *E. coli* 35218 (negatif kontrol), B: *S. aureus* 25923 (pozitif kontrol), C: *Enterococcus faecalis* RI 21, D: *Enterococcus faecalis* RT 84.

4.4 Enterokokların Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyofilm oluşumunun belirlenmesi için yapılan çalışmada bakterilerin başlangıç yoğunluğu ve canlılık sayımı yapılmıştır (Çizelge 4.5). *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen OD değerlerinin, Çizelge 4.6' da verilen Stepanović vd., (2007) tarafından belirlenen formül baz alınarak belirlenmiştir .

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri değerlendirildiğinde, pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 suşunda orta derecede biyofilm aktivitesi ve *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21 ve RT 102 suşlarında ise zayıf biyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan *S. epidermidis* ATCC 12228 suşunun ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının %82'nin ise biyofilm aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.5. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının hücre yoğunlukları ve canlılık oranları.

Test bakterileri	OD (600 nm)	kob/mL
<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	1,155	7,572
<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	1,115	7,012
<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	1,124	7,224
<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	1,026	7,334
<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	1,185	7,004
<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	1,116	7,409
<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	1,119	7,480
<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	1,138	7,408
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	1,146	7,884
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	1,132	7,988
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	1,149	7,885
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	1,083	7,248
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	1,117	7,651
<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	1,114	7,580
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	1,153	7,153
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	1,038	7,412
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	1,146	7,136
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	1,153	7,448
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	1,103	7,645
<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	1,119	7,515
<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	1,124	7,015
<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	1,068	7,733
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	1,043	8,097
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	1,153	7,312

Çizelge 4.6. Biyofilm aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan formüller (Stepanović vd., 2007).

Formül	Açıklama
$OD \leq OD_c$	Biyofilm aktivitesi yok
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf biyofilm aktivitesi
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Orta biyofilm aktivitesi
$4 \times OD_c < OD$	Güçlü biyofilm aktivitesi

Çizelge 4.7. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların biyofilm deneyi sonuçları.

Bakteri	Ort. OD	Nihai OD (Ort. OD – Odc)	Biyofilm oluşumu	
RI 42	0,323	0,119	$0,119 \leq 0,204$	-
RI 48	0,212	0,008	$0,008 \leq 0,204$	-
RI 51	0,225	0,021	$0,021 \leq 0,204$	-
RI 56	0,350	0,146	$0,146 \leq 0,204$	-
RI 57	0,289	0,085	$0,085 \leq 0,204$	-
RI 58	0,301	0,097	$0,097 \leq 0,204$	-
RI 59	0,258	0,054	$0,054 \leq 0,204$	-
RI 66	0,250	0,046	$0,046 \leq 0,204$	-
RI 6	0,317	0,113	$0,113 \leq 0,204$	-
RI 8	0,361	0,157	$0,157 \leq 0,204$	-
RI 11	0,410	0,206	$0,204 < 0,206 \leq 0,408$	+
RI 17	0,414	0,210	$0,204 < 0,210 \leq 0,408$	+
RI 19	0,230	0,026	$0,026 \leq 0,204$	-
RI 21	0,412	0,205	$0,204 < 0,208 \leq 0,408$	+
RT 84	0,291	0,087	$0,087 \leq 0,204$	-
RT 96	0,242	0,038	$0,038 \leq 0,204$	-
RT 97	0,321	0,117	$0,117 \leq 0,204$	-
RT 98	0,335	0,131	$0,131 \leq 0,204$	-
RT 102	0,414	0,210	$0,204 < 0,210 \leq 0,408$	+
RT 122	0,259	0,055	$0,055 \leq 0,204$	-
DSMZ 20447	0,337	0,133	$0,133 \leq 0,204$	-
NCDO 581	0,252	0,048	$0,048 \leq 0,204$	-
29212	0,652	0,462	$0,380 < 0,262 \leq 0,760$	++
12228	0,248	0,058	$0,058 \leq 0,190$	-

-: biyofilm aktivitesi yok

+: zayıf biyofilm aktivitesi

++: orta biyofilm aktivitesi

+++: güçlü biyofilm aktivitesi

4.5 Direnç Genlerinin Belirlenmesi

4.5.1 Vankomisin direnç genlerinin (*vanA* ve *vanB*) belirlenmesi

Enterokoklarda glikopeptid türevi vankomisin direnci, son yıllarda giderek artan ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda rol alan direnç tipi olduğundan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında vankomisin direnci ile ilişkili *vanA* ve *vanB* genleri araştırılmıştır.

vanA gen bölgesine özgü primer kullanılarak yürütülen PZR sonucunda, vankomisine duyarlı *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşu ile birlikte dokuz *Enterococcus* suşunun kromozomu üzerinde 938 bp büyüklüğünde *vanA* direnç geni belirlenmiştir (Şekil 4.5). *vanA* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

Vankomisin direnci ile *vanA* geni arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur.

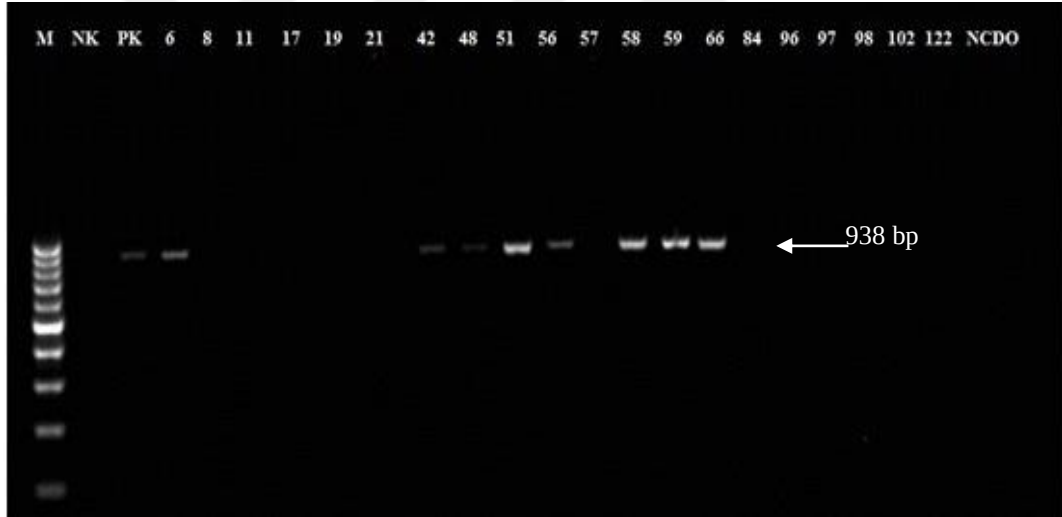
vanB gen bölgesine özgü primer kullanılarak yürütülen PZR çalışmaları sonucunda ise *E. faecium* DSMZ 20447 ve *E. faecalis* NCDO581 referans suşları ile birlikte 13 *Enterococcus* suşunun kromozomu üzerinde 600 bp büyüklüğünde *vanB* direnç geni saptanmıştır (Şekil 4.6). *vanB* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

Vankomisin direnci ile *vanB* geni arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur.

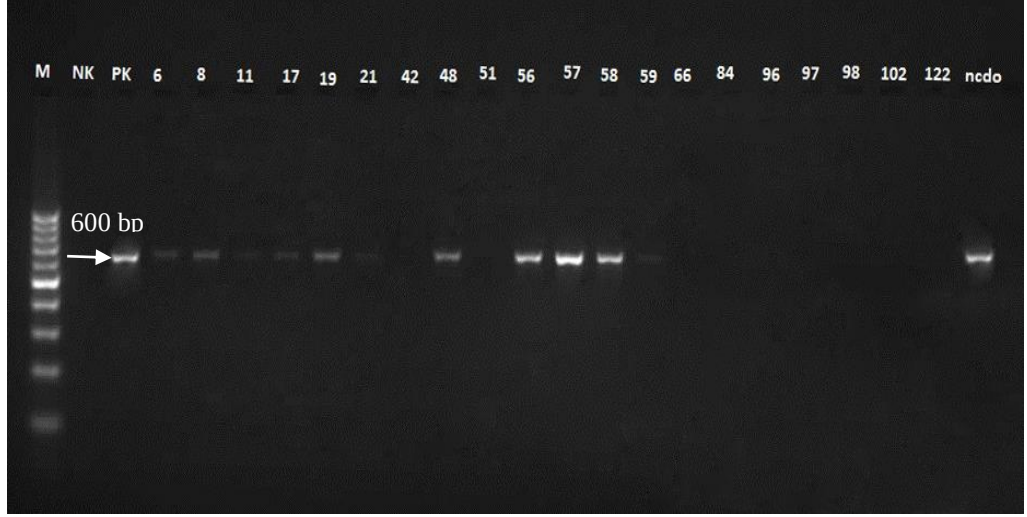
E. faecalis RI 6, *E. faecium* RI 48, RI 56, RI 58, RI 59 ve DSMZ 20447 suşlarının hem *vanA* hem de *vanB* genlerini içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Vankomisin direnç genleri ile ilgili PZR sonuçları.

No	Bakteri	vanA	vanB
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	+	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	+	+
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	+	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	+	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	-	+
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	+	+
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	+	+
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	+	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	-	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	-	+
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	-	+
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	-	+
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	-	+
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	-	-
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	-	-
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	-	-
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	-	-
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-	-
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-	+
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+	+



Şekil 4.5. *vanA* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.



Şekil 4.6. *van B* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

4.5.2 Virülans genlerin belirlenmesi

4.5.2.1 Sitolizin genlerinin (*cylA*, *cylB*) belirlenmesi

cylA, *cylB* gen bölgelerine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda *cylA*'ya ait 509 bp ve *cylB*'ye ait 756 bp' lik gen bölgesi çoğaltılmıştır. *cylA* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17). *cylA* gen bölgesi pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecium* DSMZ 20447 ve *E. faecalis* RT 97 suşunda tespit edilirken (Şekil 4.7); *cylB* geni sadece pozitif kontrolde belirlenmiştir. Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında *cylB* gen bölgesinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8) (Çizelge 4.9). Sitolizin aktivitesi ile *cylA*, *cylB* genleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Sitolizin genleri PZR sonuçları.

No	Bakteri	<i>clyA</i>	<i>clyB</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-	-
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	-	-
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	-	-
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-	-
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	-	-
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	-	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	-	-
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	-	-
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	-	-
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	-	-
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	-	-
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	-	-
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	-	-
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	-	-
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	+	-
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	-	-
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-	-
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-	-
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+	+



Şekil 4.7. *clyA* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.



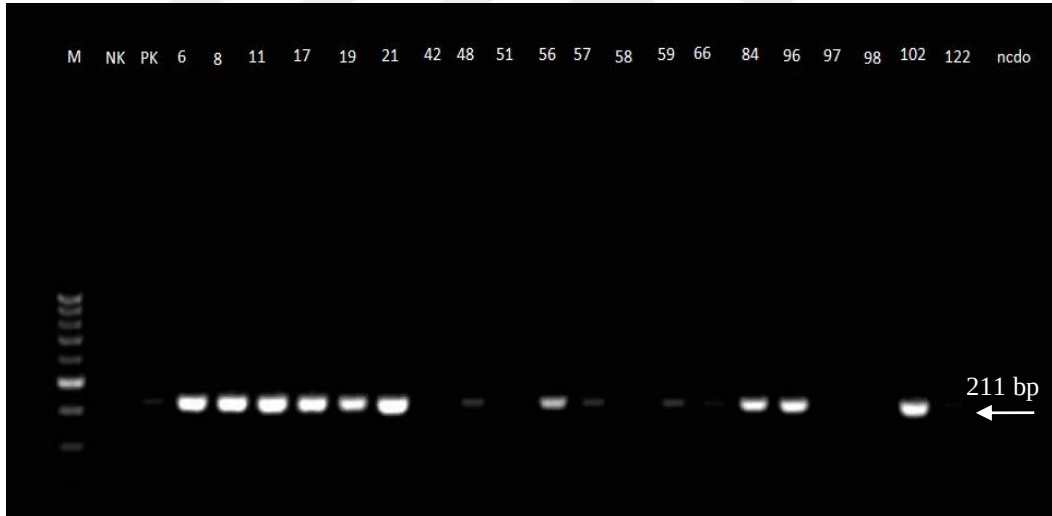
Şekil 4.8. *clyB* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

4.5.2.2 Jelatinaz geninin (*gelE*) belirlenmesi

gelE gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 211 bp' lik gen bölgesi ile yapılan PZR çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecium* DSMZ 20447 suşunda ve enterokok suşlarının %75' inde *gelE* geni bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). (Çizelge 4.10). *gelE* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17). *E. faecium* RI 42, RI 51, RI 58 suşlarında; *E. faecalis* RT 97, RT 98 suşlarında ve *E. faecalis* NCDO 581 referans suşunda ise *gelE* geni bulunamamıştır (Çizelge 4.10). *gelE* geni ile jelatinaz aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur. *gelE* geni ile biyofilm aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Jelatinaz geni PZR sonuçları.

No	Bakteri	<i>gel E</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	+
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	+
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	+
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	+
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	+
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	+
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	+
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	+
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	+
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	+
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	-
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	+
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	+
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+



Şekil 4.9. *gelE* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

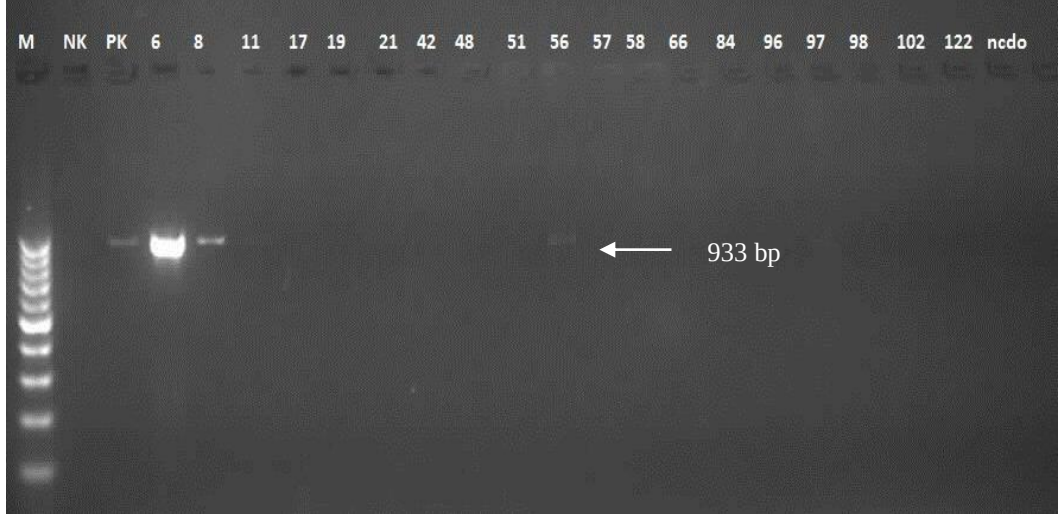
4.5.2.3 Enterokokkal yüzey proteini (esp) geninin belirlenmesi

esp gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 933 bp' lik gen bölgesi *E. faecalis* RI 6, RI 8, *E. faecium* RI 56 ve pozitif kontrol olan *E. faecium* DSMZ 20447 suşlarında çoğaltılmıştır (Şekil 4.10) (Çizelge 4.11).

esp genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17). *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının %85'inde ve *E. faecalis* NCDO 581 referans suşunda *esp* gen bölgesinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.10). *esp* geni ile biyofilm aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde arasındaki ilişki $p>0,05$ olduğundan arasındaki fark önemsiz olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.11. Enterokokal yüzey proteini (Esp) gen bölgesi ile yapılan PZR sonuçları.

No	Bakteri	<i>esp</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	-
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	-
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	-
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	-
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	-
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	-
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	-
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	-
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	-
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	-
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+



Şekil 4.10. *esp* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

4.5.2.4 Hücre agregasyon ve konjugasyon (*agg*) ile agregasyon faktörü (*asa1*) genlerinin belirlenmesi

agg gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 1553 bp' lik gen bölgesi, *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşunda ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların %65'inde çoğaltılmıştır. *agg* geni *E. faecium* 42, RI 48, RI 56, RI 58, RI 59 suşları ve *E. faecalis* RT 98, RT 122 suşları ile *E. faecalis* NCDO 581 referans suşunda tespit edilmemiştir (Çizelge 4.12) (Şekil 4.11). *agg* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

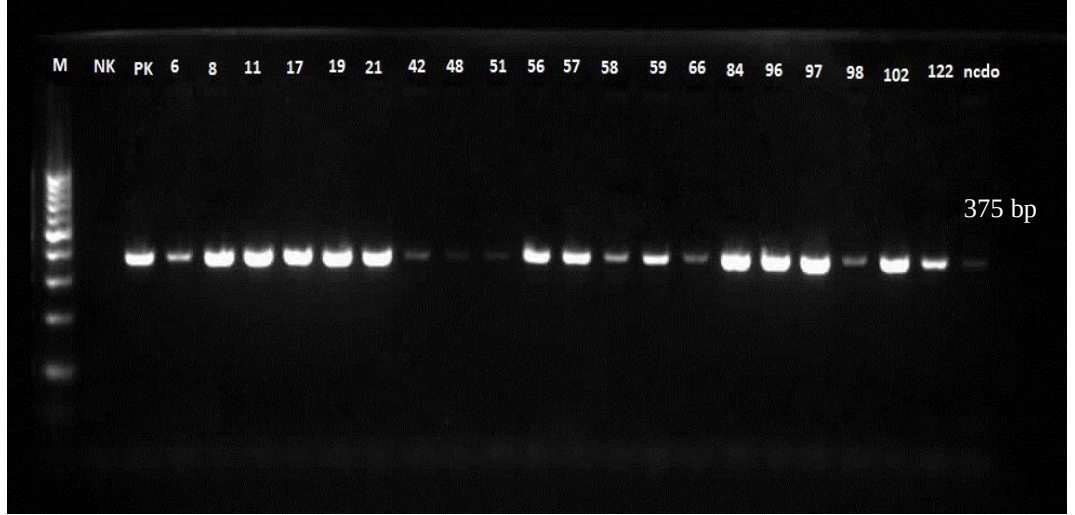
asa1 gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 375 bp' lik gen bölgesi referans suşlar dahil olmak üzere *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tamamında çoğaltılmıştır (Çizelge 4.12) (Şekil 4.12). *agg* geni bulunduğu belirlenmiştir. *asa1* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17). *asa1* geni ile biyofilm aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olduğundan arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Hücre agregasyon ve konjugasyon geniyle ilgili yapılan PZR sonuçları.

No	Bakteri	<i>agg</i>	<i>asa1</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-	+
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-	+
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	+	+
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	-	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	+	+
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-	+
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	-	+
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	+	+
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	+	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	+	+
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	+	+
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	+	+
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	+	+
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	+	+
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	+	+
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	+	+
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-	+
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	+	+
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-	+
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-	+
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+	+



Şekil 4.11. *agg* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.



Şekil 4.12. *asa1* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

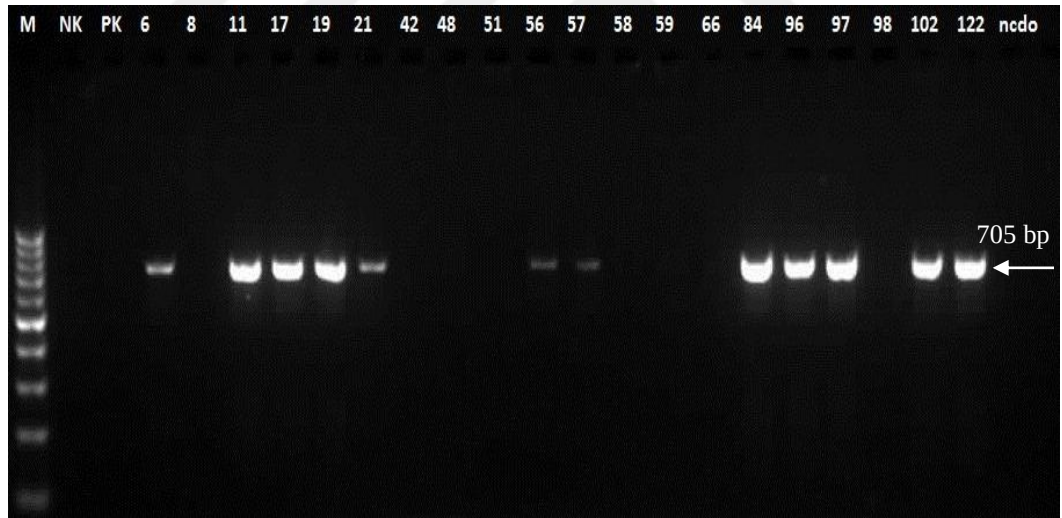
4.5.2.5 *E. faecalis* yüzey antijeni (*efaAfs*) ve *E. faecium* yüzey antijenin (*efaAfm*) genlerinin belirlenmesi

EfaAfs gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 375 bp' lik gen bölgesi referans suşlar hariç *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların %60'ında bulunduğu; *E. faecalis* RI 8, RT 98; *E. faecium* RI 42, RI 48, RI 51, RI 58, RI 59, RI 66 suşlarıyla *E. faecium* DSMZ 20447 ve *E. faecalis* NCDO 581 referans suşlarında bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 4.13) (Şekil 4.13). *efaAfs* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

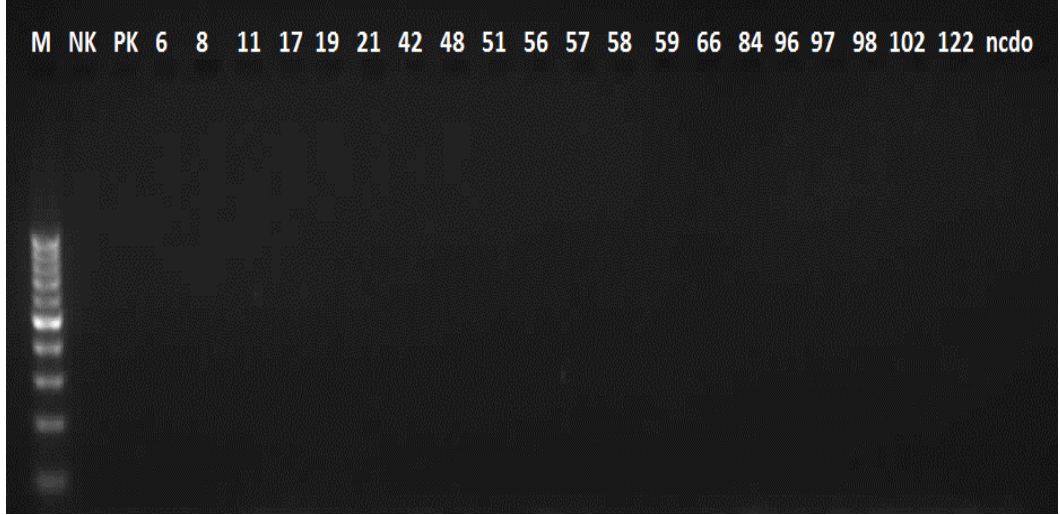
efaAfm gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda *efaAfm* geninin, referans suşlar da dahil olmak üzere *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların tamamında bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 4.13) (Şekil 4.14).

Çizelge 4.13. Enterokokal yüzey antijenleri PZR sonuçları.

No	Bakteri	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-	-
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	+	-
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	+	-
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-	-
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	-	-
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	-	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+	-
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	-	-
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	+	-
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	+	-
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	+	-
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	+	-
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	+	-
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	+	-
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	+	-
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	+	-
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	+	-
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-	-
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	-	-



Şekil 4.13. *efaAfs* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E.faecium* DSMZ 20447.



Şekil 4.14. *efaAfm* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

4.5.2.6 Seks feromon determinantlarının (*cob*, *ccf*) genlerinin belirlenmesi

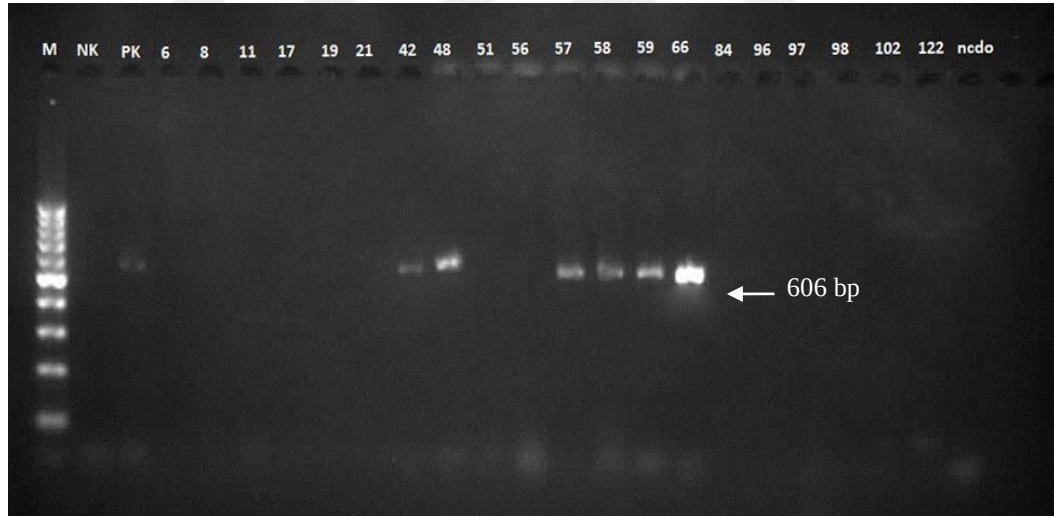
Seks feromon geni olan *cob* ile ilgili yapılan PZR çalışmalarında 606 bp' lik gen bölgesi *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşu ve *E. faecium* RI 42, RI 48, RI 57, RI 58, RI 59 ve RI 66 suşlarında tespit edilmiştir. *cob* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

E. faecalis NCDO 581 suşunda ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların %30'unda *cob* gen bölgesinin bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 4.14) (Şekil 4.15).

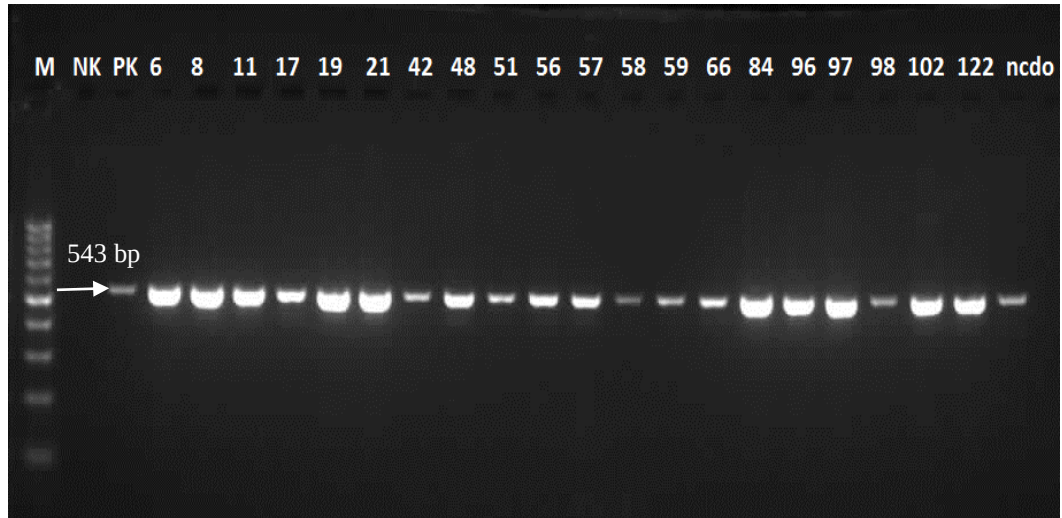
Seks feromonu olan *ccf* gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 543 bp' lik gen bölgesi referanslarda dahil olmak üzere *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tamamında çoğaltılmıştır (Çizelge 4.14) (Şekil 4.16). *ccf* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.14. Seks feromon determinantları PZR sonuçları.

No	Bakteri	cob	ccf
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	+	+
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	+	+
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-	+
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	-	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	+	+
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	+	+
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	+	+
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	+	+
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	-	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	-	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	-	+
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	-	+
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	-	+
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	-	+
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	-	+
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	-	+
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	-	+
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-	+
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	-	+
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	-	+
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-	+
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+	+



Şekil 4.15. *cob* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.



Şekil 4.16. *ccf* geni jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.

4.5.2.7 Hiyaluronidaz (*hyl*) geninin belirlenmesi

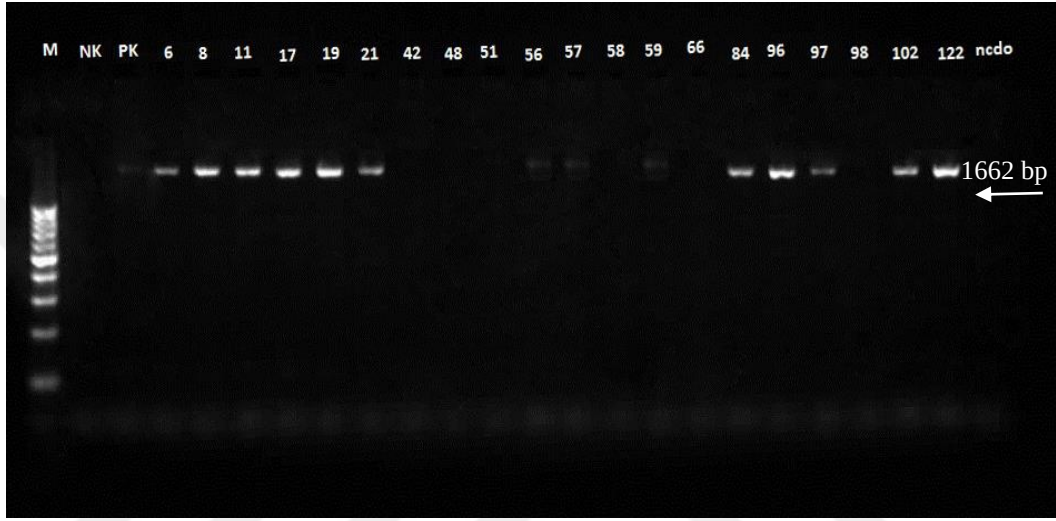
hyl gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda 1662 bp' lik gen bölgesi *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşu ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların %70' inde tespit edilmiştir. *hyl* genine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.17). *E. faecalis* NCDO 581 suşunda ve *E. faecalis* RT 98 suşuyla *E. faecium* RI 42, RI 48, RI 51, RI 58 ve RI 66 suşlarında bulunmadığı belirlenmiştir. (Çizelge 4.15) (Şekil 4.17).

Çizelge 4.15. Hiyaluronidaz geninin PZR sonuçları.

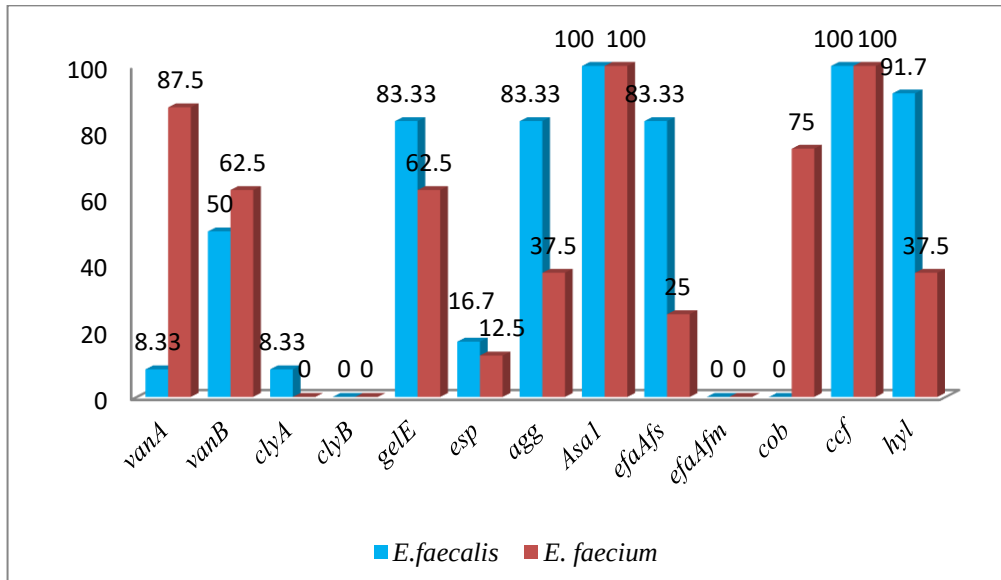
No	Bakteri	<i>hyl</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 42	-
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 48	-
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 51	-
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 56	+
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 57	+
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 58	-
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 59	+
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 66	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 6	+
10	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 8	+
11	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 11	+
12	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 17	+
13	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 19	+
14	<i>Enterococcus faecalis</i> RI 21	+

Çizelge 4.15 (devamı). Hiyaluronidaz geninin PZR sonuçları.

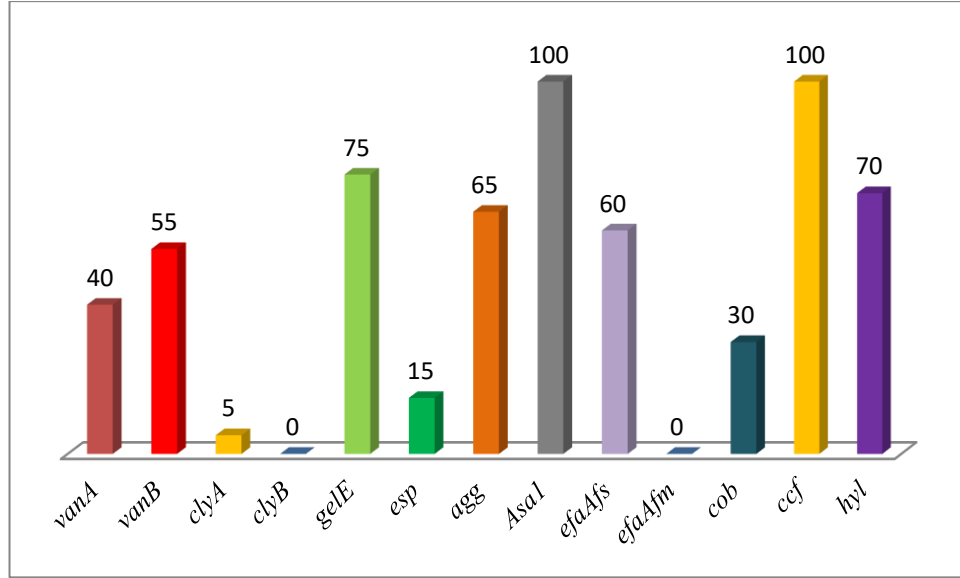
No	Bakteri	hyl
15	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	+
16	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	+
17	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	+
18	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	-
19	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	+
20	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 122	+
21	<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO 581	-
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 20447	+



Şekil 4.17. *hyl* geninin jel görüntüsü M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447.



Şekil 4.18. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik direnç ve virülens genleri (%) bulundurma oranları (referans suşlar hariç).



Şekil 4.19. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşların antibiyotik direnç ve virülens genleri (%) bulundurma oranları (referans suşlar hariç).

Çizelge 4.16. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izolasyon kaynakları ile taşıdıkları direnç ve virülens genler.

İzolasyon Kaynağı	Suşlar	Taşıdığı virülens ve direnç genleri (sayısı)
Ardabil (Tam Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 42	<i>vanA</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> (4)
Ardabil (Tam Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 48	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> (6)
Ardabil (Tam Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 51	<i>vanA</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>ccf</i> (4)
Ahvaz (Yarım Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 56	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (8)
Ahvaz (Yarım Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 57	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (8)
Ahvaz (Yarım Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 58	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> (5)
Ahvaz (Yarım Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 59	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Hamadan (Yarım Yağlı)	<i>E. faecium</i> RI 66	<i>vanA</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> (6)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 6	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (9)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 8	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 11	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 17	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 19	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Ahbar (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RI 21	<i>vanB</i> , <i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (7)
Balıkesir (Yarım Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 84	<i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (6)
Urfa Peyniri (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 96	<i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (6)
Urfa Peyniri (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 97	<i>clyA</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (6)
Urfa Peyniri (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 98	<i>asa1</i> , <i>ccf</i> (2)
Urfa Peyniri (Tam Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 102	<i>gelE</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (6)
Balıkesir (Yarım Yağlı)	<i>E. faecalis</i> RT 122	<i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (5)
NCDO 581	<i>E. faecalis</i>	<i>vanB</i> , <i>asa1</i> , <i>ccf</i> (3)
DSMZ 20447	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>clyA</i> , <i>clyB</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>asa1</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>hyl</i> (11)

4.6 DNA Dizi Analizi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarında *vanA*, *vanB*, *agg*, *asa1*, *ccf*, *cob*, *efaAfs*, *clyA*, *esp*, *gelE* ve *hyl* direnç ve virülens genlerin varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA’lardan bazılarında dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen direnç ve virülens genlere ait dizi analizi sonuçları gen bankalarıyla karşılaştırılarak PZR ürünleri doğrulanmıştır. Dizi analizlerini karşılaştırmak amacıyla National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılmıştır. Dizi analizine ait blast sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.



Çizelge 4.17. DNA dizi analizi blast sonuçları.

Gen	Blast Sonuçları					
	Tanımlama	Maksimum skor	Toplam skor	Sorgu sonucu	E değeri	Erişim numarası
Agg	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DD14 genome	1816	1816	92%	0.0	CP021161.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> V583 chromosome, complete genome	1790	2790	91%	0.0	AE016830.1
	<i>Enterococcus faecium</i> plasmid pHKK701 aggregation substance (ash701) gene, complete cds	1607	1607	91%	0.0	U91527.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DPN94 aggregation substance protein (asp1) gene, partial cds	996	996	73%	0.0	KU311662.1
Asa1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DPN94 aggregation substance protein (asa1) gene, partial cds	346	346	98%	3e-91	KU311658.1
	<i>S. faecalis</i> plasmid pAD1 asa1 gene for aggregation substance and ORF 1	364	364	98%	9e-97	X17214.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 12.8a aggregation substance protein (asa1) gene, partial cds	370	370	97%	2e-98	KT598461.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 11.5a aggregation substance protein (asa1) gene, partial cds	366	366	96%	3e-97	KT598460.1
vanA	<i>Enterococcus faecium</i> isolate 2014-VREF-268, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP019992.1
	<i>Enterococcus faecium</i> isolate 2014-VREF-63, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP019988.1
	<i>Enterococcus faecium</i> isolate 2014-VREF-114, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP019970.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain 2014-VREF-41, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP019208.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS_VRE_9, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP018830.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS_VRE_12, complete genome	1343	1592	96%	0.0	CP018828.1
vanB	<i>Enterococcus faecium</i> NRRL B-2354, complete genome	1485	1485	98%	0.0	CP004063.1
	<i>Enterococcus faecium</i> isolate E1334 genome assembly, chromosome: 1	1485	1485	98%	0.0	LR134095.1
	<i>Enterococcus faecium</i> isolate E0139 genome assembly, chromosome: 1	1485	1485	98%	0.0	LR132067.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS_VRE_4, complete genome	1465	1465	97%	0.0	CP012447.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain SRCM103470 chromosome, complete genome	1437	1437	97%	0.0	CP035220.1
clyA	<i>Enterococcus faecalis</i> strain sorialis, complete genome	850	850	99%	0.0	CP015883.1
	Plasmid pAD1 (from <i>Enterococcus faecalis</i>) cylL1, cylLs, cylM, clyB, cylA genes, complete cds	870	870	98%	0.0	L37110.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> putative pathogenicity island, partial sequence	854	854	98%	0.0	AY032999.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain TLME3 CylA (cylA) gene, complete cds	843	843	98%	0.0	JQ794947.1
cob	<i>Enterococcus faecalis</i> strain CVM N48037F chromosome, complete genome	1120	1120	97%	0.0	CP028720.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain CVM N60443F chromosome, complete genome	1120	1120	97%	0.0	CP028724.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DPN94 pheromone cOB1 precursor/lipoprotein (cob) gene, partial cds	1120	1120	97%	0.0	KU311661.1
ccf	<i>Enterococcus faecalis</i> strain sorialis, complete genome	909	909	98%	0.0	CP015883.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DD14 genome	909	909	98%	0.0	CP021161.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> V583 chromosome, complete genome	909	909	98%	0.0	AE016830.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain L12, complete genome	893	893	98%	0.0	CP018102.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> ccf protein gene, partial cds	874	874	92%	0.0	KX198029.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> endocarditis specific antigen (efaA) gene, partial cds	1194	1194	99%	0.0	KY070337.1
efaAfs	<i>Enterococcus faecalis</i> endocarditis specific antigen gene, complete cds	1182	1182	99%	0.0	U03756.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DPN94 endocarditis specific antigen (efaA) gene, partial cds	1179	1179	97%	0.0	KU311663.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 608/96 endocarditis specific antigen (efaA) gene, partial cds	981	981	80%	0.0	HQ003886.1

Çizelge 4.17 (devamı). DNA dizi analizi blast sonuçları.

Gen	Blast Sonuçları					
	Tanımlama	Maksimum skor	Toplam skor	Sorgu sonucu	E değeri	Erişim numarası
esp	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCTC8732 genome assembly, chromosome: 1	1659	1659	99%	0.0	LR594051.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain FDAARGOS_324 chromosome, complete genome	1659	1659	99%	0.0	CP028285.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain FDAARGOS_338 chromosome, complete genome	1659	1659	99%	0.0	CP022059.2
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain LD33, complete genome	1659	1659	99%	0.0	CP014949.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> DENG1, complete genome	1659	1659	99%	0.0	CP004081.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> 62, complete genome	1659	1659	99%	0.0	CP002491.1
	<i>Enterococcus</i> sp. enrichment culture clone Gull_19_2 surface protein (<i>esp</i>) gene, partial cds	1659	1659	99%	0.0	EU815372.1
	<i>Enterococcus</i> sp. enrichment culture clone DK_4_4 surface protein (<i>esp</i>) gene, partial cds	1659	1659	99%	0.0	EU815336.1
	<i>Enterococcus</i> sp. enrichment culture clone Horse_2_9 surface protein (<i>esp</i>) gene, partial cds	1653	1653	99%	0.0	EU815373.1
	<i>Enterococcus</i> sp. enrichment culture clone DK_4_8 surface protein (<i>esp</i>) gene, partial cds	1653	1653	99%	0.0	EU815371.1
gelE	<i>Enterococcus faecalis</i> strain DPN94 gelatinase (<i>gelE</i>) gene, partial cds	691	691	99%	0.0	KU311665.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain MD4 gelatinase (<i>gelE</i>) gene, partial cds	695	695	99%	0.0	MH720045.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain LN68 <i>Fsr</i> and <i>gelE-sprE</i> operons, complete sequence	695	695	99%	0.0	JN246675.1
	<i>Enterococcus faecalis sprE</i> , <i>gelE</i> , <i>fsrC</i> , <i>fsrB</i> , <i>fsrD</i> and <i>fsrA</i> genes, strain LN68	695	695	99%	0.0	HE574483.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> gelatinase (<i>gelE</i>) DNA, complete cds	695	695	99%	0.0	D85393.1
hyl	<i>Enterococcus faecium</i> strain V24 plasmid pV24-1, complete sequence	3070	3070	98%	0.0	CP036152.1
	<i>Enterococcus faecium</i> hyaluronidase (<i>hyl</i>) gene, complete cds	3070	3070	98%	0.0	KY654070.1
	<i>Enterococcus faecium</i> putative hyaluronidase (<i>hyl</i>) gene, complete cds	3064	3064	97%	0.0	AF544400.1

4.7 Plazmid DNA İzolasyonu

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarında plazmid varlığı ile ilgili yapılan agaroz jel çalışmasında *E. faecium* RI 56 suşunun 3 tane, *E. faecium* RI 58 ve RI 59 suşlarının ise 4 tane plazmid içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar moleküler büyüklükleri bilinen ticari plazmid markerın (λ DNA/HindIII; Thermo Scientific) jel göçü esas alındığında moleküler büyüklükleri *E. faecium* RI 56 suşu 4361 bp'den küçük 2032 bp'den büyük 2 plazmid ve yaklaşık 125 bp büyüklüğünde ise 1 plazmid içerdiği belirlenmiştir. *E. faecium* RI 58 suşu ise 4361 bp'den küçük 2032 bp'den büyük 1 plazmid, 2032 bp'den küçük 564 bp'den büyük 2 plazmid ve yaklaşık 125 bp büyüklüğünde 1 plazmid içerdiği belirlenmiştir. *E. faecium* RI 59 suşu ise 4361 bp'den küçük 2032 bp'den büyük 1 plazmid, 2032 bp'den küçük 564 bp'den büyük 2 plazmid ve yaklaşık 125 bp büyüklüğünde 1 plazmid içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının plazmid içerikleri M; DNA Marker *E. faecium* RI 56 (2032 bp < 1,2 < 4361 bp; 3 ~ 125 bp), *E. faecium* RI 58 (2032 bp < 4 < 4361 bp; 564 bp < 5,6 < 2032 bp; 7 ~ 125 bp), *E. faecium* RI 59 (2032 bp < 8 < 4361 bp; 564 bp < 9,10 < 2032 bp; 11 ~ 125 bp).

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Enterokoklar yüksek sıcaklık, düşük pH gibi uygun olmayan çevresel koşullara karşı dirençli olmalarından dolayı geniş bir habitatta bulunmaktadır. Özellikle geleneksel fermente peynir ve et ürünlerinden izole edilebilirler (Vael ve Goossens, 2002). LAB bakterilerinin önemli bir üyesi olan enterokokların; metabolik ve enzimatik aktiviteleri sonucunda gıdalarda tat-aroma katmaları, çeşitli probiyotik özellikler sergilemelerinin yanı sıra bazı gıda ve klinik izolatlarının fırsatçı patojen oldukları bilinmektedir. Enterokoklar özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlar olmak üzere bakteriyemi, endokardit gibi birçok hastalığın oluşmasında rol almaktadırlar (Foulqué Moreno vd., 2006).

Fırsatçı patojen olarak enterokokların patojenitesinin oluşmasındaki en önemli etmen çoklu ilaç direncinin bulunmasıdır. Enterokoklarda intrinsik ve kazanılmış olmak üzere iki tip ilaç direnci görülmektedir (Kankaya vd., 2017). Patojenitenin belirlenmesinde rol alan diğer etmen ise virülens faktörlerdir. Virülens faktörler, mikroorganizmalara patojenik özellikler kazandırarak hastalık yapıcı etkisini artıran efektör moleküllerdir (Busani vd., 2004). Enterokoklarda genellikle sitolizin, jelatinaz, agregasyon maddesi, seks feromonları, enterokokal yüzey adhezinleri, hiyaluronidaz, enterokok antijenleri ve hiyalüronidaz gibi virülens faktörlerin bulunduğu belirtilmektedir (Kayaoğlu ve Ørstavik, 2004). Enterokokların virülens faktörleri ve antibiyotik dirençlilikleri üzerine yapılacak olan her çalışma, onların patojenitelerinin daha iyi anlaşılmasına ve biyogüvenliklerinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Bu sebeple yapılmış olan bu çalışmada, Türkiye ve İran'ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilerek tanımlanmış, potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş olan enterokokların; sitolizin aktivitelerinin, antibiyotik duyarlılıklarının, jelatinaz aktivitelerinin ve biyofilm üretimlerinin *in vitro* olarak test edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca enterokokların vankomisin direnç genleri (*vanA*, *vanB*), sitolizin genleri (*clyA*, *clyB*), jelatinaz geni (*gelE*), agregasyon genleri (*agg*, *asa1*), seks feromon genleri (*cob*, *ccf*), enterokokal yüzey proteini geni (*esp*), enterokokal yüzey adhezinlerine ait genler (*efaAfm*, *efaAfs*), hiyaluronidaz geni (*hyl*) ve plazmid DNA varlığı moleküler yöntemlerle incelenerek patojenitesinin ve biyogüvenilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sitolizin virülensliğe katkı sağlayan, hemolitik aktivitenin oluşmasında rol oynayan bir toksindir. Sitolizin üretimi *clyA*, *clyB*, *clyM* gibi birden fazla genin rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Eaton ve Gasson, (2001) ve Theppangna vd., (2007) yaptıkları çalışmalarda, sitolizin genlerini barındıran *Enterococcus* sp. suşlarının, β -hemolitik aktiviteye sahip olabileceği bildirmiştir. Cosentino vd., (2010) ve Medeiros vd., (2014) ise, enterokokların β -hemolitik olmayan suşlarında sitolizin genlerini taşıyabileceğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarından *E. faecalis* RT 97 ve pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşunda *clyA* geni tespit edilirken; *clyB* geni sadece *E. faecium* DSMZ 20447 suşunda belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Bununla birlikte, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ise kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan γ -hemolitik suşlar oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.1). *clyA* geni bulunan *E. faecalis* RT 97 ve pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecium* DSMZ 20447 referans suşunda β - hemolitik aktivitenin olmaması sitolizin biyosentezinden sorumlu tüm genleri içermemediğini göstermektedir. İnoğlu ve Tuncer, (2013) Türk tulum peynirinden izole edilen *Enterococcus* sp. suşları ile yaptıkları çalışmada, test edilen suşların *cylB* geni içerdiğini, sadece 5 suşun ise *cylA* geni içerdiğini ancak suşların hemolitik aktivite göstermediğini bildirmişlerdir. Landete vd., (2018) ise bebek dışkılarından izole ettikleri *E. faecalis* suşlarından yedi tanesinin tüm sitolizin genlerini içerdiğini fakat hiçbirinin hemolitik aktivite sergilemediklerini tespit etmişlerdir.

Antibiyotiklere karşı direnç, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili patojen bakterilerde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Enterokoklarda ise klinik kaynaklı izolatlarda antimikrobiyal ajanlara karşı artan bir direnç mevcuttur. Ayrıca klinik kaynaklardan veya hastane enfeksiyonlarından edinilmiş suşlar arasında çoklu antibiyotik direnç prevalansı tanımlanmıştır (Aguirre ve Collins, 1993; Foulqué Moreno vd., 2006). Enterokokların sefalosporinler ve düşük düzeyde aminoglikozidler gibi çok sayıda antibiyotiğe intrensek direnç göstermelerinin yanı sıra, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıkça görülen tetrasiklin, eritromisin, rifampin, kloramfenikol, yüksek düzeyde aminoglikozit direnci, beta laktam direnci ve glikopeptid direnci olan vankomisin dirençli enterokokların (VRE) kazanılmış direnç oranı sürekli olarak artmaktadır (Cantón vd., 2010; Kankaya vd., 2017).

Süt ürünlerinden izole edilen enterokokların ampisilin, klindamisin, aminoglikozitler, eritromisin, kloramfenikol ve tetrasiklin olmak üzere çoğu antibiyotiğe karşı, çevresel ve klinik kaynaklardan izole edilen suşlardan daha yüksek hassasiyet gösterdiği bildirilmiştir (Aguirre vd., 1993; Knudtson ve Hartman, 1993). Ayrıca, gıdalardan izole edilen enteroklarda vankomisin direnci dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç tespit edilmemiştir (Giraffa vd., 1997).

Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca son yıllarda hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan antibiyotik direnci olan glikopeptid türevi vankomisin antibiyotiğine karşı direnç genleri de PZR yöntemiyle incelenmiştir. Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının sitoplazmik zar sentezi inhibitörü olan polimiksin B antibiyotiğine dirençli oldukları belirlenirken, hücre duvarı sentezini inhibe eden penisilin, vankomisin antibiyotiklerine ve protein sentezini inhibe eden kloromfenikol, gentamisin antibiyotiklerine %100 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Protein sentezini inhibe eden tetrasikline ise %90 oranında yüksek duyarlılık göstermiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.2). Ayrıca vankomisin direnç genleri ile yapılan PZR çalışmalarında referans suşlar hariç *E. faecalis* suşlarının %8,33'ü ve *E. faecium* suşlarının %87,5'inde *vanA* geni; *E. faecalis* suşlarının %50'sinde ve *E. faecium* suşlarının % 62,5'inde *vanB* geni saptanmıştır (Şekil 4.18). Ayrıca suşların %25'inde ve ise hem *vanA* hem de *vanB* geni bulundurmaktadır (Çizelge 4.8). Yapılan antibiyogram testleri sonucunda kullandığımız enterokok suşlarının vankomisine yüksek duyarlılık göstermesi, direnç genlerinin regülasyonu ile ilgili genlerle ilişkili olarak suşlarda bulunan vankomisin direnç genlerinin aktivite göstermemesi vankomisin genlerinin sessiz gen olarak bulunduğunu göstermektedir.

Tuncer vd., (2013) yaptıkları çalışmada, tulum peynirinden izole ettikleri bakteriyosin üreten 3 tane *E. faecium* suşunun antibiyotik duyarlılığı ile ilgili yaptıkları çalışmada suşların tamamının ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, streptomisin, tetrasiklin, sülfametoksazol / trimetoprim ve vankomisine duyarlı olduğunu; yalnızca eritromisine direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Et ürünlerinde, süt ürünlerinde ve tüketime hazır gıdalarda yaygın olarak bulunan bu bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı doğal ve kazanılmış olarak dirence sahip olduğunu bildirmişlerdir. Özmen Toğay vd., (2010) çeşitli gıdalardan izole ettikleri *Enterococcus* sp. suşların test edilen antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olduğunu; bununla birlikte, test edilen bazı enterokok suşlarının eritromisine (% 14), tetrasikline (% 32), gentamisin (% 6), kanamisin (% 24) ve kloramfenikole (% 3) karşı oldukça dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları PZR çalışması sonucunda *vanB* geninin hiçbir izolatta tespit edilmediğini; *vanA* geninin ise, sosis (S6-4) ve peynirden (P3-1) izole edilen *E. faecalis* suşlarının ikisinde bulunduğunu ama *E. faecalis* P3-1 suşunun vankomisine direnç gösterirken, *E. faecalis* S6-4 suşunun vankomisine direnç göstermediğini bildirmişlerdir.

GelE geni tarafından kondlanan jelatinaz hücre dışı proteolitik bir enzimdir. Jelatin, kollajen, hemoglobin ve diğer biyoaktif peptidleri hidrolize ederek bakteriyel göç ve yayılıma olanak sağlamaktadır (Foulquié Moreno vd., 2006). Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının jelatinaz aktivitesi ve jelatinaz biyosentezinde sorumlu *gelE* geni PZR yöntemiyle incelenmiştir. *gelE* geni için yapılan PZR çalışmasında *E. faecalis* suşlarının % 83,3'ü ve *E. faecium* suşlarının ise % 62,5'inin *gelE* geni içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.18). *gelE* geni içeren *E. faecalis* RI11, RI17, RI21 ve RT 84 suşlarının jelatinaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.4). *gelE* genine sahip diğer suşlarda jelatinaz aktivitesinin olmaması bu bakterilerde *gelE* geninin sessiz gen olarak bulunduğunu göstermektedir.

İnoğlu ve Tuncer, (2013) yaptıkları çalışmada *gelE* geni içeren *E. faecalis* suşlarından % 57,1'inin jelatinaz aktivitesinin olduğunu fakat *gelE* geni içeren *E. faecium* suşlarının jelatinaz aktivitesi göstermediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Barbosa vd., (2010) test ettikleri *Enterococcus* sp. suşlarının % 29,7'sinin *gelE* geni taşıdığını, bu suşların sadece %26,4'ünün jelatinaz aktivitesine sahip olduğunu ve % 73,6'sının ise sessiz gen içermelerinden dolayı jelatinaz aktivitesi göstermediklerini tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Nakayama vd., (2001) *gelE* geninin ifadesinin *fsr* lokusu tarafından düzenlendiğini, jelatinaz aktivitesinin olması için *fsr* lokusunun bulunması gerektiğini bildirmişlerdir.

Biyofilmler, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanan proteinlerin, polisakkaritlerin, nükleik asitlerin ve ekzopolimerik maddelerin hidratlanmış hücre dışı matriksinde kaplanan sıkı sıkıya bağlı bakteri popülasyonlarının oluşturduğu yapılardır (Costerton, 2001; Vlamakis vd., 2013). Biyofilmler, çeşitli yollarla bakteriyel virülansa katkıda bulunur. Biyofilm gelişiminde agregasyon maddeleri, enterokokal yüzey proteini geni (*esp*) ve jelatinaz geni (*gelE*) gibi önemli enterokok virulans genlerin ve bu genlere ait proteinlerin rol aldığı bildirilmiştir (Nallapareddy ve Murray, 2006; Pires-Bouccedil vd., 2010). Metaloproteaz olan jelatinaz enzimi; kollajeni, kazeini ve hemoglobini parçalayarak biyofilm gelişimine neden olmaktadır (Hancock ve Perego, 2004). Yüzey proteini Esp' nin ise özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında, bakterinin yüzeye yapışmasına ve biyofilm oluşumuna aracılık ederek enterokokal patogeneizde rol aldığı bildirilmiştir (Mohamed vd., 2004).

Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarından *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 21 ve RT 102'in suşlarının zayıf biyofilm aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Zayıf biyofilm aktivitesine sahip RI 11, RI 17 ve RI 21 suşlarının jelatinaz aktivitesi de sergilediği ancak RT 102'nin jelatinaz aktivitesi olmadığı belirlenmiştir. Biyofilm aktivitesi tespit edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında *esp* geni bulunmazken; *agg* geni içeren suşların % 28,57'sinde biyofilm aktivitesi tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, agregasyon maddesi (*agg*), jelatinaz (*gelE*) ve enterokokal yüzey proteini (*esp*) genlerinin biyofilm aktivitesi için yeterli olmadığını fakat bu virülens belirleyicilerin biyofilm oluşumunu desteklediğini göstermektedir.

Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, Chajęcka-Wierzchowska vd., (2016) yaptıkları çalışmada kullandıkları 35 enterokok izolatlarının tamamının *esp* pozitif olmasına rağmen, sadece 15'inin biyofilm aktivitesinin olduğu; 31 *gelE* pozitif suştan 14'ünün biyofilm pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar *gelE*-negatif bir suşun ise biyofilm aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Rahimi vd., (2018) yaptıkları çalışmada biyofilm aktivitesi olan enterokok suşlarının % 54,3'nün *gelE* geni ve % 56,6'sının *esp* geni içerdiğini; biyofilm aktivitesi olmayanlardan ise % 6,2'sinin *gelE* ve % 9,2'sinin *esp* geni içerdiğini tespit etmişlerdir.

Enterokokal yüzey proteini (esp) hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir. İdrar yolu enfeksiyonlarında bakterilerin epitel yüzeye ilk bağlanmasında ve biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynar (Sharifi vd., 2012). Ayrıca bakterinin immün sistemden korunmasında ve bazı antibiyotik dirençlerinin oluşmasında katkısı olduğu bildirilmiştir (Distel vd., 2002). *esp* geni konjugasyonla aktarılabilen bir gendir (Coque vd., 2005; Upadyaya vd., 2009). Yapılan çalışmalarda, klinik izolatların *esp* genini gıda izolatlarından daha fazla bulundurduğu bildirilmiştir (Franz vd. 2001; Archimbaud vd., 2002). Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* RI 6, RI 8, *E. faecium* RI 56 ve pozitif *E. faecium* DSMZ 20447 olmak üzere toplam suşların %18,2'sinde *esp* geni tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Eaton ve Gasson, (2001) yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının % 44'ünde ve *E. faecium* suşlarının % 78'inde *esp* geni tespit ederken; *esp* genini sadece gıda örneklerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının % 33'ünde tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Agregasyon maddeleri (*agg* ve *asa1*) feromona duyarlı bakteriyel bir adezindir. Konjugasyonda ve epitel yüzeylere yapışmada rol oynamaktadır. *Agg*'nin üriner sistem enfeksiyonlarında bakterinin renal hücrelere yapışmasına aracılık ettiği ve endokardit modelinde agregat boyutunu arttırdığı bildirilmiştir (Chow vd., 1993). Yapılan araştırmalarda *asa1*'inde aynı şekilde endokarditli hayvan modellerinde böbrek tübüler hücrelerine, kalp endokardiyal hücrelerine ve bağırsak epitel hücrelerine bakteri yapışmasını arttırdığı bildirilmiştir (Vankerckhoven vd., 2004). Agregasyon maddeleri ile ilgili yaptığımız PZR çalışmalarına göre *E. faecalis* suşlarının % 83,33'ünün ve *E. faecium* suşlarının % 37,5'inin *agg* genini içerdiği belirlenirken; *Enterococcus* sp. suşların tamamının *asa1* genini içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

Popović vd., (2018) süt ürünlerinden izole ettikleri 13 *Enterococcus* sp. suşlarının % 63,2'sinin *agg* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Noguchi vd., (2011) yaptıkları çalışmada probiyotik ürünlerde bulunan 13 *Enterococcus* sp. suşlarından bir tanesinin *agg* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Anderson vd., (2016) yaptıkları çalışmada ise bizim çalışmamıza benzer şekilde gıda kaynaklı izolatların tamamının *asa1* geni içerdiğini bildirmişlerdir.

Pieniz vd., (2015) ise potansiyel probiyotik *Enterococcus durans* LAB18s suşunda agregasyon genlerini saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Cinsiyet hormonları olarakta bilinen seks feromonları *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad* genlerinde kromozomal olarak kodlanan, küçük, hidrofobik peptitlerdir (Clewell ve Weaver, 1989). Seks feromonları, virülans faktörü olarak kabul edilmemekle birlikte enterokoklarda üretilmeleri sonucunda, salgılanan feromona yanıt veren konjugatif plazmitlerin taşıdığı virülans belirleyicilerinin ve antibiyotik direnç özelliklerinin yayılmasını destekleyebilmektedirler (Belgacem vd., 2010). Çalışmamızda seks feromon belirleyicileri olan *cob* ve *ccf* genlerinin PZR taraması yapılmıştır. PZR çalışmaları sonucunda *E. faecium* suşlarının % 75'inde tespit edilirken, *E. faecalis* suşlarında tespit edilmemiştir. *ccf* geni ise tüm *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarda tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

Valenzuela vd., (2008) Fas'taki gıdalardan izole ettikleri *Enterococcus* sp. suşları ile yaptıkları PZR çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak, *E. faecalis* suşlarında seks feromon determinantlarının (*cpd*, *cob*, *ccf*) çok yüksek oranda bulunduğunu ancak bunların hiçbirinin *E. faecium* suşlarında tespit edilemediğini bildirmişlerdir. İnoğlu ve Tuncer, (2013) yaptıkları çalışmada tulum peynirinden izole ettikleri *Enterococcus* sp. suşlarda bizim sonuçlarımıza benzer şekilde *ccf* genini yüksek oranda belirlemişlerdir. İnoğlu ve Tuncer, (2013) yine aynı çalışmada, diğer cinsiyet feromon belirleyicisi olan *cpd*, *cob* ve *cad* genlerinin hiçbir suşta belirlemediklerini bildirmişlerdir.

Mangan resptörü olarak görev alan adhezin benzeri enterokokal antijen A (*E. faecalis* antijen A proteini *EfaAfs* ve *E. faecium* antijen A proteini *EfaAfm*) endokardit antijenleri olarakta bilinmekte olup, üretimleri potansiyel virülans belirleyicileri olarak kabul edilir. *E. faecalis* hücre duvarı adhezinin (*efaAfs*) kalp hücrelerine yapışmaya katkıda bulunduğu ve endokardit ciddiyetini arttırdığı öne sürülmüştür (Hwanhlem vd., 2017). Bununla birlikte, *efaAfm* geninin bir virülans faktörü olarak tam rolü hala bilinmemektedir. Ayrıca enterokokların hem klinik hem de gıda izolatlarında, enterokokal antijen A genlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Lowe vd., 1995; Eaton ve Gasson, 2001).

Yaptığımız PZR çalışmaları sonucunda *E. faecalis* suşlarının % 83,33'ünde belirlenirken; *E. faecium* suşlarından sadece *E. faecium* RI 56 ve *E. faecium* RI 57 suşlarında *efaAfs* geni saptanmıştır (Çizelge 4.13). (Şekil 4.18). *efaAfm* geni ise hiçbir enterokok suşunda belirlenmemiştir.

Avcı ve Tuncer, (2017) geleneksel Türk peynirlerinden izole ettikleri 5 *E. faecalis* ve 6 *E. faecium* suşlarından *E. faecalis* MBE20-5, MBE29-1 ve *E. faecium* MBE12-3, MBE15-2, MBE22-2, MBE27-2 ve MBE27-3 suşları *efaAfm* geni içerirken; hiçbir suşun *efaAfs* genini içermediğini tespit etmişlerdir. Yine aynı şekilde İspirli vd., (2017) beyaz Türk peynirlerinden izole ettikleri 12 *Enterococcus* sp. suşların türlere bağlı olmaksızın *efaAfm* ve *efaAfs* genlerinin yüksek oranda bulunduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte 8 suşun hem *efaAfm* hem de *efaAfs* genini içerdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalara ek olarak Popović vd., (2018) yaptıkları çalışmada potansiyel probiyotik özellik gösteren süt izolatlarında *efaAfm* ve *efaAfs* genlerinin türlere bağlı olmaksızın yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir.

hyl geni tarafından kromozomda kodlanan hiyalüronidaz, hiyalüronik asidi üzerinde etkili olan doku hasarı ile ilişkili bir enzimdir (Hynes ve Walton, 2000). Virülans faktörü olan hiyalüronidaz ilk olarak *E. faecium*'da tanımlanmıştır ve doku hasarı ile ilişkilidir (Fisher ve Phillips, 2009). Hiyalüronidaz enziminin sekresyonundan sorumlu olan *hyl* geni ile ilgili yaptığımız PZR çalışmalarına göre çalışmamızda *E. faecalis* suşlarının % 91,7'sinde ve *E. faecium* suşlarının % 37,5'inde *hyl* geni saptanmıştır (Şekil 4.18).

Hosseini vd., (2016) yaptıkları PZR çalışmalarında, keçi sütünden izole ettikleri 24 *Enterococcus* sp. suşundan *E. faecalis* suşlarının % 15,4'ünün ve *E. faecium* suşlarının % 10'unun *hyl* geni içerirken; *E. avium* suşunun *hyl* geni içermediğini bildirmişlerdir. Landete vd., (2006) anne sütü alan bebeklerden izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* ile yaptıkları PZR çalışmalarında, 12 *E. faecium* suşlarından bir tanesinin *hyl* genini bulundurduğunu; *E. faecalis* suşlarının ise *hyl* geni içermediğini bildirmişlerdir. Arshadi vd., (2017) klinik ve çevresel kaynaklardan izole edilen vankomisin dirençli *E. faecium* izolatların %34'ünün *hyl* geni içerdiğini tespit etmişlerdir.

Enterokokların direnç genleri ve virülens genlerle ilgili genetik bilginin transferinde rol oynayan transpozon, insersiyon dizileri ve plazmidler içerdiği bildirilmiştir. Enterokoklar çok sayıda plazmid bulundurabilirler (Giraffa, 2002; Klare vd., 2003). Enterokoklarda plazmid varlığının belirlenmesi amacıyla yaptığımız çalışmada, moleküler büyüklükleri yaklaşık olarak 4361 ile 125 bp olan *E. faecium* RI 56 suşunda 3 tane, *E. faecium* RI 58 ve RI 59 suşlarında ise 4 tane plazmid bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20).

Rosvoll vd., (2010) yaptıkları çalışmada 93 *E. faecium* izolatının %94,6'sının 1 ile 7 tane arasında plazmid içerdiğini bildirmişlerdir. Abriouel vd. (2006), yaptıkları çalışmada ise gıda kaynaklı enterokokların birden fazla plazmid içerdiklerini bildirmişlerdir. Ezeah vd., (2019) klinik kaynaklı 15 enterokok izolatının 4'ünün (*E. faecium*, *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. avium*) 1000 bp'den büyük plazmid içerdiğini; 2 *E. faecalis* izolatının ise 100 ile 500 bp arasında plazmidler içerdiğini bildirmişlerdir.

Genel olarak çalışmada kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında yapılan PZR çalışmalarında en çok virülens gen içeren bakteri *E. faecalis* RI 6 suşu 9 virülens gen (*vanA*, *vanB*, *gelE*, *esp*, *agg*, *asa1*, *efaAfs*, *ccf*, *hyl*); en az virülens gen içeren bakteri ise *E. faecium* RT 98 suşu 2 virülens gen (*asa1*, *ccf*) olarak belirlenmiştir. Ayrıca Ahbar tam yağlı peynirden izole edilen *E. faecalis* suşlarından *E. faecalis* RI 11, RI 17, RI 19 ve RI 21'in *vanB*, *gelE*, *agg*, *asa1*, *efaAfs*, *ccf*, *hyl* genleri olmak üzere yedişer gen içermektedir (Çizelge 4.16). Yapılan PZR çalışmalarında *asa1* ve *ccf* genleri tüm suşlarda belirlenirken; *clyB* ve *efaAfm* genleri hiçbir suшта belirlenmemiştir. Ayrıca *asa1* ve *ccf* genlerinden sonra en çok bulunan gen % 75 oranında *gelE* geni iken en az bulunan gen % 5 oranında *clyA* geni olarak bulunmuştur (Şekil 4.19).

Sonuç olarak potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının biyogüvenilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yaptığımız çalışmalarda başta glikopeptid türevi vankomisin olmak üzere kloramfenikol (fenikol), tetrasiklin (tetrasiklin), gentamisin (aminoglikozid) ve penisilin G (penisilin) gibi çoğu antibiyotiğe yüksek duyarlılık göstermesi ve hiçbir suşun sitolizin aktivitesinin olmaması onların potansiyel probiyotik ve starter kültür olarak kullanılabilmesi için

umut verici bir sonuçtur. Jelatinaz aktivitesi ve biyofilm aktivitesi bakterinin patojenitesinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu sebepten dolayı *E. faecalis* RI 11 (jelatinaz pozitif, zayıf biyofilm aktivitesine sahip), *E. faecalis* RI 17 (jelatinaz pozitif, zayıf biyofilm aktivitesine sahip), *E. faecalis* RI 21 (jelatinaz pozitif, zayıf biyofilm aktivitesine sahip), *E. faecalis* RT 84 (jelatinaz pozitif) ve *E. faecalis* RT 102 (zayıf biyofilm aktivitesine sahip) suşlar probiyotik olarak kullanım açısından risk taşımaktadır. Plazmid bulundurmayan, sitolizin , jelatinaz, biyofilm aktivitesi olmayan, çoğu antibiyotiğe karşı yüksek duyarlılık gösteren, çoğunlukla klinik izolatlarda bulunan ve önemli virülens belirleyicisi olan enterokokal yüsey proteini ve hiyalüronidaz genlerini içermeyen *E. faecalis* RT 98 suşu ve *E. faecium* RI 42, RI 48, RI 51, RI 66 suşları potansiyel probiyotik ve starter kültür olarak kullanılabilmesi için umut verici sebeplerdir. Ancak bu suşlarda bulunan virülens genlerin önemli virülens belirleyiciler olmamasına karşın bu suşların tam olarak biyogüvenilirliğinin sağlanabilmesi için *in vivo* çalışmaların da yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Omar, N. B., López, R. L., Martínez-Cañamero, M., Keleke, S. ve Gálvez, A., 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods pototo and dégué by using three different DNA extraction methods, *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 228-233.
- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E. ve Maqueda, M., 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco, *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1, 141-150.
- Aguirre, M. ve Collins, M., 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 2, 95-107.
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M. Kuliyeve, A., Gombossy de Melo Franco, B.D., Chobert, J.M. ve Haertlé, T., 2013. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30, 631-641.
- Al Atya, A.K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A. ve Drider, D., 2015. Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium, *Frontiers Microbiology*, 6, 227.
- Allen, W., Linggood, M. ve Porter, P., 1996. *Enterococcus* organisms and their use as probiotics in alleviating irritable bowel syndrome symptoms, *European Patent*, 508701, B1.
- Amaral, D.M., Silva, L.F., Casarotti, S.N., Nascimento, L.C.S. ve Penna, A.L.B., 2017. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties, *Journal of Dairy Science*, 100, 2, 933-949.
- Anas, M., Ahmed, K. ve Mebrouk, K., 2014. Study of the antimicrobial and probiotic effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from raw goat's milk from the region of Western Algeria, *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*13, 18-27.
- Anderson D. J., Murdoch D. R., Sexton D. J. ve Reller L. B., 2004. Risk factors for infective endocarditis in patients with enterococcal bacteremia: a case-control study, *Infection*, 32(2):72–77. PubMed PMID: 15057570.
- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E. ve Al-Ahmad, A., 2016. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1534.

- Araújo, T.F. ve Ferreira, C.L.d.L.F., 2013. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns, Brazilian Archives of Biology and Technology, 56, 3, 457-466.
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M.S., Charbonné, F. ve Joly, B., 2002. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains, Research in Microbiology, 153, 2, 75-80.
- Arias, C.A. ve Murray, B.E., 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance, Nature Reviews Microbiology, 10, 4, 266.
- 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, 300-304.
- Arshadi, M., Douraghi, M., Shokoohizadeh, L., Moosavian, S.M. ve Pourmand, M.R., 2017. High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran, Microbial Pathogenesis, 111, 212-217.
- Avci, M. ve Tuncer, B.O., 2017. Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses, Polish Journal of Microbiology, 66, 2, 223-233.
- Bab, I.A., Sela, M.N., Ginsburg, I. ve Dishon, T., 1979. Inflammatory lesions and bone resorption induced in the rat periodontium by lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans*, Inflammation, 3, 4, 345-358.
- Barbosa, J., Gibbs, P. ve Teixeira, P., 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal, Food Control, 21, 5, 651-656.
- Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A. ve Manai, M., 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat, Food Control, 21, 4, 462-470.
- Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora, Trends in Microbiology, , 11, 430-435.
- Busani, L., Del Grosso, M., Paladini, C., Graziani, C., Pantosti, A., Biavasco, F. ve Caprioli, A., 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and-resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections, International Journal of Food Microbiology, 97, 1, 17-22.

- Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., Chaves, R.L. ve Johnson, A.P., 2010. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6):1126-36.
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M. ve Maqueda, M., 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain, *Food Microbiology*, 30, 59-67.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. ve Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2016. Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps, *LWT-Food Science and Technology*, 69, 117-122.
- Chow, J., Thal, L., Perri, M., Vazquez, J.A., Donabedian, S., Clewell, D. ve Zervos, M., 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 11, 2474-2477.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. ve Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1, 1-20.
- Clewell, D.B. ve Weaver, K.E., 1989. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*, *Plasmid*, 21, 3, 175-184.
- CLSI, 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M-100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25 th, Informational Supplement. M100-S25 CLSI, Wayne Pennsylvania.
- Coque, T.M., Willems, R.J., Fortún, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., Cantón, R. ve Baquero, F., 2005. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 7, 2693-2700.
- Cosentino, S., Podda, G., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M. ve Pisano, M.B., 2010. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia, *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 51, 1.
- Costerton, J.W., 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *Trends in microbiology*, 9, 2, 50-52.
- Coşkun, T., 2006. Pro-, pre-ve sinbiyotikler, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49, 2, 128-148.
- Courvalin, P., 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci, *Clinical Infectious Diseases*, 42, Supplement_1, S25-S34

- de Melo Pereira, G.V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A.I.M., Thomaz-Soccol, V. ve Soccol, C.R., 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology advances*, 2060-2076.
- Devriese, L., Baele, M. ve Butaye, P., 2006. The genus *Enterococcus*: Taxonomy, In: Dworkin, The Prokaryotes: Vol. 7: proteobacteria: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria, Springer Science & Business Media, 4:163-174.
- Devriese, L., Ceyssens, K., Rodrigues, U. ve Collins, M., 1990. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines, *FEMS Microbiology Letters*, 71, 3, 247-251.
- Distel, J.W., Hatton, J.F. ve Gillespie, M.J., 2002. Biofilm formation in medicated root canals, *Journal of Endodontics*, 28, 10, 689-693.
- Eaton T.J. ve M.J. Gasson. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1628–1635.
- Fan, Y.-j., Chen, S.-j., Yu, Y.-c., Si, J.-m. ve Liu, B., 2006. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial, *Journal of Zhejiang University Science B*, 7, 12, 987-991.
- FAO/WHO, (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, FAO/WHO London, Ontario, Canada.
- Favaro, L., Penna, A.L.B. ve Todorov, S.D., 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses—application in biopreservation?, *Trends in Food Science & Technology*, 41, 1, 37-48.
- Fernandes, S.C. ve Dhanashree, B., 2013. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species, *The Indian Journal of Medical Research*, 137, 5, 981
- Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M., Valdivia, E. ve Maqueda, M., 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 5, 1350-1361.
- Fisher, K. ve Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*, *Microbiology*, 155, 6, 1749-1757.
- Foulqué Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. ve De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health, *International Journal Food Microbiology*. 106, 1–24.

- Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J. ve Holzapfel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9, 4385-4389
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. ve Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 2-3, 105-122.
- Garrido, A.M., Gávez, A. ve Pulido, R.P., 2014. Antimicrobial resistance in enterococci, *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, doi: 10.4172/2332-0877.1000150.
- Garssen, J., Herreilers, M., Van Loveren, H. ve Vos, J., 2004. Immunomodulation by probiotics: a literature survey.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J. ve Manai, M., 2008. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese, *Food Control*, 19, 2, 162-169.
- 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, 2-3, 215-222.
- Giraffa, G., Carminati, D. ve Neviani, E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use, *Journal of Food Protection*, 60, 6, 732-738.
- Giraffa, G., Olivari, A. ve Neviani, E., 2000. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses, *Food Microbiology*, 17, 6, 671-677.
- Gismondo, M., Drago, L. ve Lombardi, A., 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 4, 287-292.
- Gomes, A.M. Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 4-5, 139-157.
- Graninger, W. ve Ragette, R., 1992. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis, *Clinical Infectious Diseases*, 15, 1, 49-57.
- Gülbandılar, A. ve Dönmez, M., 2017. Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanılan Probiyotikler ve Özellikleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10, 1, 44-47.

- Haas, W. ve Gilmore, M.S., 1999. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*, Medical Microbiology and Immunology, 187, 4, 183-190.
- Hällgren, A., Claessona, C., Saeedia, B., Monsteina, H.J., Hanberger, H. ve Nilssona, N.L., 2009. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and *in vitro* adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin, International Journal of Medical Microbiology, 299, 323–332.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. ve Hammami, R., 2018. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns An update, Frontiers in Microbiology, 9.
- Hancock, L.E. ve Perego, M., 2004. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase, Journal of Bacteriology, 186, 17, 5629-5639.
- Hardie, J. ve Whiley, R., 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, Journal of Applied Microbiology, 83, S1, 1S-11S.
- Herman, D.J. ve Gerding, D.N., 1991. Antimicrobial resistance among enterococci, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35, 1, 1.
- Hızel, K., 2011. Dirençli Gram pozitif kok infeksiyonlarının tedavi ve yönetimi, ANKEM Dergisi, 25, 50-53.
- Higuita, N. I. A., ve Huycke, M. M., 2014. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment, In Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet], Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E. ve Mikes, Z., 2005. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels, Bratisl Lek Listy, 106, 2, 67-72.
- Holmes, N.E., Ballard, S.A., Lam, M.M., Johnson, P.D. ve Grayson, M.L., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2013. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68, 9, 2134-2139.
- Hord, N.G., 2008. Eukaryotic-microbiota crosstalk: Potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics, Annual Review of Nutrition, 28, 215-231.
- Hosseini, S.M., Zeyni, B., Rastyani, S., Jafari, R., Shamloo, F., Tabar, Z. ve Arabestani, M.R., 2016. Presence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp collected from dairy products and meat, Der Pharmacia Lettre, 8, 4, 138-145.

- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y. ve Haertlé, T., 2017. Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties, *Food Control*, 78, 187-195.
- Hynes, W.L. ve Walton, S.L., 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 183, 2, 201-207.
- Ike, Y. ve Clewell, D., 1992. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome, *Journal of Bacteriology*, 174, 24, 8172-8177.
- İnoğlu, Z.N. ve Tuncer, Y., 2013. Safety Assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish Tulum Cheese, *Journal of Food Safety*, 33, 3, 369-377.
- İspirli, H., Demirbaş, F. ve Dertli, E., 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 75, 358-365.
- Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I. ve Roland, N., 2002. Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: *in vivo* and *in vitro* investigations, *Le Lait*, 82, 1, 131-144.
- Javed, A., Masud, T., ul Ain, Q., Imran, M. ve Maqsood, S., 2011. Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives, *Annals of Microbiology*, 61, 4, 699-708.
- Jett, B.D., Huycke, M.M. ve Gilmore, M.S., 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462-478.
- Johnson, A.P., 1994. The pathogenicity of enterococci, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 6, 1083-1089.
- Kačániová, M., Haščík, P., Arpášová, H., Pavelková, A., Petrová, J., Hleba, L. ve Rovná, K., 2013. *Enterococcus* genus identification isolated from gastrointestinal tract of chickens after bees products application using MALDI TOF MS Biotyper, *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 46(2), 114-118.
- Kankaya, D.A., Tuncer, B.Ö. ve Tuncer, Y., 2017. Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri, *GIDA/The Journal of FOOD*, 42, 1.
- Kayaoglu, G. ve Ørstavik, D., 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15, 5, 308-320.

- Kern, M., Aschenbach, J.R., Tedin, K., Pieper, R., Loss, H. ve Lodemann, U., 2017. Characterization of inflammasome components in pig intestine and analysis of the influence of probiotic *Enterococcus faecium* during an *Escherichia coli* Challenge, *Immunological Investigations*, 46, 7, 742-757.
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S. ve Das, G., 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 3, 927-939.
- Khalkhali, S. ve Mojgani, N., 2018. *In vitro* and *in vivo* safety analysis of *Enterococcus faecium* 2C isolated from human breast milk, *Microbial Pathogenesis*.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G. ve Witte, W., 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*, *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 269-290.
- Knudtson, L.M. ve Hartman, P.A., 1993. Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources, *Journal of Food Protection*, 56, 6, 489-492.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. ve Huebner, J., 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities, *Vaccine*, 22, 7, 822-830.
- Kristich, C.J., Rice, L.B. ve Arias, C.A., 2014. Enterococcal infection treatment and antibiotic resistance. In: *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Eds: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, p.
- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M.C. ve Alvarez, M.A., 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?, *Food Microbiology*, 30, 1, 132-138.
- Landete, J.M., Peirotén, A., Medina, M., Arqués, J.L. ve Rodríguez-Mínguez, E., 2018. Virulence and antibiotic resistance of enterococci isolated from healthy breastfed infants, *Microbial Drug Resistance*, 24, 1, 63-69.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J. ve Willems, R.J., 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity, *Journal of Bacteriology*, 186, 3, 672-682.
- Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4, 999-1007.
- Linden, P.K., Pasculle, A.W., Manez, R., Kramer, D.J., Fung, J.J., Pinna, A.D. ve Kusne, S., 1996. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to

- vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*, *Clinical Infectious Diseases*, 22, 4, 663-670.
- Liu, W., Zhang, L., Shi, J., Yi, H., Zhang, Y., Zhang, S., Gao, W., Du, M., Han, X. ve Yu, X., 2015. Assessment of the safety and applications of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation paocai, *Food Control*, 50, 637-644.
- Low, Y.L., Jakubovics, N.S., Flatman, J.C., Jenkinson, H.F. ve Smith, A.W., 2003. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*, *Journal of Medical Microbiology*, 52, 2, 113-119.
- Lowe, A., Lambert, P. ve Smith, A., 1995. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci, *Infection and Immunity*, 63, 2, 703-706.
- Mansour, N.M., Heine, H., Abdou, S.M., Shenana, M.E., Zakaria, M.K. ve El-Diwany, A., 2014. Isolation of *Enterococcus faecium* NM113, *Enterococcus faecium* NM213 and *Lactobacillus casei* NM512 as novel probiotics with immunomodulatory properties, *Microbiology and Immunology*, 58, 559-569.
- Marinho, A.R., Martins, P.D., Ditmer, E.M., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J., Van Der Sand, S.T. ve Frazzon, A.P.G., 2013. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 2, 423-426.
- Marton, I., Balla, G., Hegedus, C., Redl, P., Szilagyi, Z., Karmazsin, L. ve Kiss, C., 1993. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis, *Molecular Oral Microbiology*, 8, 4, 254-257.
- Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V.d., Martins, P.D., d'Azevedo, P.A., Van der Sand, S., Frazzon, J. ve Frazzon, A.P.G., 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1, 327-332.
- Metan, G., Zarakolu, P. ve Unal, S., 2005. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci, *Journal of Hospital Infection*, 61, 2, 93-99.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. ve Falkow, S., 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *Journal of Bacteriology*, 127, 3, 1529-1537.
- Moellering Jr, R.C., 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc*, *Principles and Practice of Infectious Disease*, 1826-1835.
- Mohamed, J.A. ve Huang, D.B., 2007. Biofilm formation by enterococci, *Journal of Medical Microbiology*, 56, 12, 1581-1588.

- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F. ve Murray, B.E., 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*, *Infection and Immunity*, 72, 6, 3658-3663.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrichetto, C., Lombardi, A. ve Lodi, R., 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from northwest Italian dairy products, *International Dairy Journal*, 16, 867-875.
- Murdoch, D.R., Corey, G.R., Hoen, B., Miró, J.M., Fowler, V.G., Bayer, A.S., Karchmer, A.W., Olaison, L., Pappas, P.A. ve Moreillon, P., 2009. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study, *Archives of Internal Medicine*, 169, 5, 463-473.
- Murray, B., (1998). Enterococci In: Gorbach, S.; Bartlett, J and Blacklow, N (editors) *Infectious Diseases*, WB Saunders Co.
- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A.D., De Vos, W.M. ve Nagasawa, H., 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*, *Molecular Microbiology*, 41, 1, 145-154.
- Nallapareddy, S.R. ve Murray, B.E., 2006. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* ace transcription, a mechanism for modulating host-*E. faecalis* interaction, *Infection and Immunity*, 74, 9, 4982-4989.
- Noguchi, N., Nakaminami, H., Nakase, K. ve Masanori, S., 2011. Characterization of *Enterococcus* Strains Contained in Probiotic Products, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 9, 1469-1473.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T. ve Takeda, Y., 2001. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid, *International Journal of Food Microbiology*, 68, 1-2, 135-140.
- Ogier, J.C. ve Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus *International Journal of Food Microbiology*. 126, 291–301.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. ve Isolauri, E., 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 1-4, 279-289.
- Özmen Toğay, S., Çelebi Keskin, A., Açıık, L. ve Temiz, A., 2010. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods, *Journal of Applied Microbiology*, 109, 3, 1084-1092.

- Pandey, K.R., Naik, S.R. ve Vakil, B.V., 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 12, 7577-7587.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. ve Kim, H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 6, 1171-1185.
- Patterson, J.E., Sweeney, A.H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J. ve Lyons, R.W., 1995. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome, *Medicine*, 74, 4, 191-200.
- Penna, A.L.B., Paula, A., Casarotti, S.N., Diamantino, V. ve Silva, L., 2015. Overview of the functional lactic acid bacteria in the fermented milk products, *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, 1, 100-154.
- Pieniz, S., Martin de Moura, T., Vaz Cassenego, A.P., Andreazza, R., Guedes Frazzon, A.P., de Oliveira Camargo, F.A. ve Brandelli, A., 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect, *Food Control*, 51, 49-54.
- Pires-Bouccedil, P.D., Izumi, E., Furlaneto-Maia, L., Sturion, L. ve Suzart, S., 2010. Effects of environmental and nutritional factors on gelatinolytic activity by *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources, *African Journal of Microbiology Research*, 4, 10, 969-976.
- Poeta, P., Costa, D., Sáenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J. ve Torres, C., 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52, 9, 396-402.
- Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N. ve Veljović, K., 2018. New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates, *Frontiers in Microbiology*, 9, 78.
- Pridmore, R.D., Pittet, A.-C., Praplan, F. ve Cavadini, C., 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity, *FEMS Microbiology Letters*, 283, 2, 210-215.
- Rahimi, N., Poursina, F., sadat Ghaziasgar, F., Sepehrpor, S. ve Hassanzadeh, A., 2018. Presence of virulence factor genes (*gelE* and *esp*) and biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from urinary tract infection in Isfahan, Iran, *Gene Reports*, 13, 72-75.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. ve McCormick, J.K., 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice, *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4, 658-672.

- Ross, R., Fitzgerald, G., Collins, K. ve Stanton, C., 2002. Cheese delivering biocultures--probiotic cheese, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 2, 71.
- Rosvoll, T. C., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P. J., Sollid, J. E., Simonsen, G. S. ve Sundsfjord, A., 2010. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501-and pHT β -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58(2), 254-268.
- Rowland, I.R., 2009. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 15, 13, 1524-1527.
- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F. ve de Valdez, G.F., 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 2-3, 241-245.
- Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., De Niederhäusern, S. ve Bondi, M., 2002. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 75, 1-2, 163-170.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. ve Rowland, I., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *British Journal of Nutrition*, 80, (Suppl. 1), 147-171.
- Sanchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, L.M., Cintas, C. ve Hernández, P.E., 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), *International Journal of Food Microbiology*, 117, 295-305.
- Sanders, M.E., 2003. Probiotics: considerations for human health, *Nutrition reviews*, 61, 3, 91-99.
- Santos, K.M.O.d., Vieira, A.D.S., Salles, H.O., Oliveira, J.d.S., Rocha, C.R.C., Borges, M.d.F., Bruno, L.M., Franco, B.D.G.d.M. ve Todorov, S.D., 2015. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 1, 237-249.
- Sartor, R.B., 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology*, 134, 2, 577-594.
- Schleifer, K.H. ve Kilpper-Bälz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34, 1, 31-34.

- Serban, D.E., 2014. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics, *Cancer Letters*, 345, 2, 258-270.
- Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G. ve Gilmore, M.S., 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein, *Infection and Immunity*, 67, 1, 193-200.
- Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Varshochi, M., Hasani, A., Aghazadeh, M. ve Milani, M., 2012. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of North west of Iran, *The Open Microbiology journal*, 6, 34.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. ve Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci, *Journal of Pathology, Mikrobiology and Immunology*, 115, 8, 891-899.
- Sudha, R.M. ve Bhonagiri, S., 2012. Efficacy of *Bacillus coagulans* strain Unique IS-2 in the treatment of patients with acute diarrhea, *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 7, 1.
- Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S.M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. ve Swings, J., 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 3, 577-581.
- Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K. ve Chaieb, K., 2016. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens, *Microbial pathogenesis*, 97, 213-220.
- Tanasupawat, S., Sukontasing, S. ve Lee, J.-S., 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 7, 1630-1634.
- Temiz, A., 2014. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Altıncı baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, Türkiye.
- Theppangna, W., Murase, T., Tokumaru, N., Chikumi, H., Shimizu, E. ve Otsuki, K., 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins, *Journal of Veterinary Medical Science*, 69, 12, 1235-1239.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.a.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R. ve Lasa, I., 2001. The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 10, 4538-4545.

- Torlak, E., Korkut, E., Uncu, A.T. ve Şener, Y., 2017. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey, *Journal of Infection and Public Health*, 10, 6, 809-813.
- Trotter, K.M. ve Dunny, G.M., 1990. Mutants of *Enterococcus faecalis* deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids, *Plasmid*, 24, 1, 57-67.
- 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.
- Turkmen, N., Akal, C. ve Özer, B., 2019. Probiotic dairy-based beverages: A review, *Journal of Functional Foods*, 53, 62-75.
- Upadhyaya, P.G., Ravikumar, K. ve Umapathy, B., 2009. Review of virulence factors of *enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 4, 301.
- Vael, C. ve Goossens, H., 2002. Enterococci as probiotics: Chances and challenges, *Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects*, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31.
- Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M. ve Gálvez, A., 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 8, 2648-2652.
- Vankerckhoven, V., van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. ve Goossens, H., 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4473-4479.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R. ve Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way, *Nature Reviews Microbiology*, 11, 3, 157.
- Vonk, R.J., Reckman, G.A., Harmsen, H.J. ve Priebe, M.G., 2012. Probiotics and lactose intolerance, *Intech*, 7, 149-160.
- Waters, C.M., Antiporta, M.H., Murray, B.E. ve Dunny, G.M., 2003. Role of the *Enterococcus faecalis* *GelE* protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins, *Journal of Bacteriology*, 185, 12, 3613-3623.
- Willems, R.J. ve Bonten, M.J., 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: Deciphering virulence, resistance and epidemicity, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20, 4, 384-390.

- Willems, R.J., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuvél, M., Tribe, D., Manzioros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Mascini, E.M. ve van Kregten, E., 2001. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals, *The Lancet*, 357, 9259, 853-855.
- Yeşilova, Y., Sula, B., Yavuz, E. ve Uçmak, D., 2010. Probiyotikler, *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 21 (1): 49-56.
- Yıldırım, M., 2007. Enterokoklarla gelişen infeksiyonlar, *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 46-52.
- Zhang, F., Qiu, L., Xu, X., Liu, Z., Zhan, H., Tao, X., Shah, N.P. ve Wei, H., 2017. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats, *Journal of Dairy Science*, 100, 3, 1618-1628.
- Zommiti, M., Cambronel, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M., Ferchichi, M. ve Connil, N., 2018. Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”, *Frontiers in Microbiology*, 9.
- URL-1 < <https://bacdiv.dsmz.de/strain/4586#ref2367> > Erişim Tarihi: 24.10.18.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Orhan ORUÇ
Adres : Fevzi Çakmak Mahallesi, Menderes Caddesi No:74
Erkmen Kasabası/ Afyonkarahisar
E-posta adresi : ooruc94@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2013-2017
Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2017-

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Oruç, O., Önal Darılmaz, D., Çetin, O., Beyatlı, Y., 2018. Geleneksel Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Potansiyel Probiyotik *Enterococcus faecalis* Suşlarında Sitolizin Aktivitesi ve Vankomisin Direnç Genlerinin Biyogüvenlik Değerlendirmesi Uluslararası Avrasya Kongresi, “Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam”, Ankara, Bildiriler Kitabı, 680-686.